

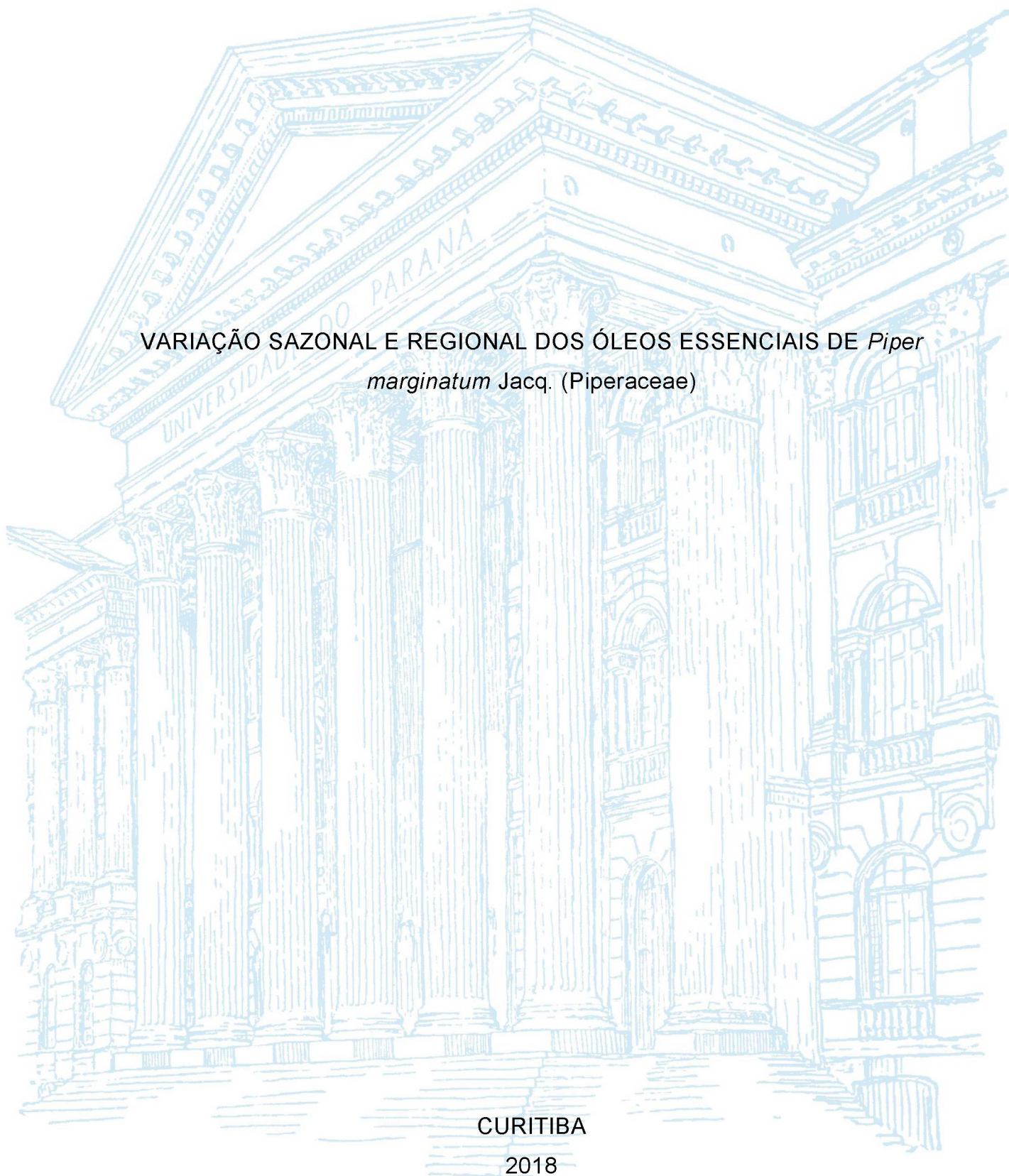
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REBECA GABRIEL DE CAMARGO

VARIAÇÃO SAZONAL E REGIONAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)

CURITIBA

2018



REBECA GABRIEL DE CAMARGO

VARIAÇÃO SAZONAL E REGIONAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper
marginatum* Jacq. (Piperaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Lameiro
de Noronha Sales Maia
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Thalita Gilda Santos

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C172v

Camargo, Rebeca Gabriel de

Variação sazonal e regional dos óleos essenciais de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) [recurso eletrônico] /Rebeca Gabriel de Camargo. – Curitiba, 2018.

Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientadora: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia.
Coorientadora: Thalita Gilda Santos.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Extração (Química). 3. Antioxidantes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Santos, Thalita Gilda. IV. Título.

CDD: 661.806

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **REBECA GABRIEL DE CAMARGO** intitulada: **Variação sazonal e regional dos óleos essenciais de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

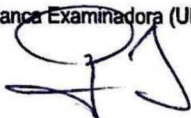
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 10 de Outubro de 2018.



BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



FRANCISCO DE ASSIS MARQUES

Avaliador Interno (UFPR)



MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Avaliador Externo (IAC)

Dedico este trabalho aos meus pais, Arilde Sutil Gabriel e Daniel Lemes de Camargo, e ao meu namorado, Daniel de Castro Palma, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Arilde Sutil Gabriel e Daniel Lemes de Camargo, e ao meu irmão, Ivan Gabriel de Camargo, pelo apoio, incentivo e por sempre estarem presentes.
- Ao meu namorado, Daniel de Castro Palma, pelo amor e carinho constantes.
- À Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia e à Prof^a. Dr^a. Thalita Gilda Santos pela orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos.
- Ao Prof. Dr. Diones Krinski (UNEMAT) pela coleta do material vegetal.
- Ao Prof. Dr. Cícero Deschamps por ceder a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia (UFPR) para extração dos óleos.
- À Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte do CPQBA-UNICAMP pela realização dos ensaios antimicrobianos.
- Aos professores Dr. Brás Heleno de Oliveira e Dr^a. Aurea Portes Ferriani pelas contribuições na banca de qualificação.
- Aos professores da banca Dr^a. Marcia Ortiz Mayo Marques e Dr. Francisco de Assis Marques pela disponibilidade em contribuir e avaliar este trabalho.
- Aos meus amigos da vida.
- Aos meus amigos do LAPNEQ.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.
- Ao PPGQ-UFPR e à CAPES pela infraestrutura e oportunidade para a realização desta pesquisa.

“O homem não é nada em si mesmo. Não passa de uma probabilidade infinita. Mas ele é o responsável infinito desta probabilidade”

Albert Camus

RESUMO

O gênero *Piper* L. (Piperaceae Giseke) possui 292 espécies produtoras de óleos essenciais distribuídas pela Amazônia brasileira e Mata Atlântica. Os óleos voláteis da espécie *Piper marginatum* Jacq. são conhecidos por possuírem atividades biológicas, sendo constituídos principalmente por terpenos e arilpropanoides, os quais apresentam variações na sua composição, atribuídas a diferenças climáticas e ambientais. Neste trabalho, foi determinada a variação sazonal e regional da composição química dos óleos essenciais das folhas de *P. marginatum* coletada nas Regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, nas quatro estações do ano. Ao todo foram identificados 63 constituintes por Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e pelo Índice Aritmético (IA), sendo eles das classes dos hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e arilpropanoides. Os constituintes majoritários encontrados foram os hidrocarbonetos sesquiterpênicos β -cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno, os sesquiterpenos oxigenados óxido de cariofileno e espatulenol e os arilpropanoides miristicina, 3,4-metilenodioxipropiofenona, elemicina, 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno, exalatacina e pipermarginina. Para cada região, verificou-se, através da Análise de Componentes Principais (ACP), que há diferenças quantitativas entre as composições dos óleos essenciais de cada estação. Em relação às diferenças regionais, notou-se que a Região Nordeste é distinta das demais, apresentando constituintes majoritários específicos, fato corroborado pela ACP e pela Análise de Agrupamento Hierárquica. Os constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais do material botânico coletado na Região Nordeste, que não puderam ser identificados pelo IA, foram isolados por Cromatografia em Camada Delgada e identificados por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . É o primeiro relato da presença das substâncias 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno e pipermarginina em óleos essenciais, sendo os seus IAs determinados neste trabalho como 1629 e 1720, respectivamente. As análises antimicrobianas mostraram que os óleos essenciais mais ativos foram os das Regiões Centro-Oeste e Norte, sendo as melhores atividades observadas contra a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, com concentração inibitória mínima (CIM) de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, pelos óleos essenciais das estações de verão e outono da Região Centro-Oeste e da estação de outono da Região Norte. Contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, todos os óleos apresentaram inibição, sendo a mais significativa apresentada pelo óleo essencial da estação de inverno da Região Nordeste (CIM = $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$).

Palavras-chave: *Piper marginatum*. Óleo essencial. Variação sazonal. Variação regional. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The genus *Piper* L. (Piperaceae Giseke) has 292 species present on the Brazilian Amazon and Atlantic forests. The volatile oils of the *Piper marginatum* Jacq. species are known for their biological activities and are mainly composed of terpenes and arylpropanoids, whose compositions vary due to seasonal and environmental differences. In this study, the seasonal and regional chemical composition variation of the essential oils from the leaves of *P. marginatum* collected in three regions (Center-West, North and Northeast) were evaluated. A total of 63 compounds were identified by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry and Arithmetical Index (AI), which belonged to the classes of monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes and arylpropanoids. The major compounds were sesquiterpene hydrocarbons β -caryophyllene, germacrene D and bicyclogermacrene, oxygenated sesquiterpenes caryophyllene oxide and spathulenol and arylpropanoids myristicin, 3,4-methylenedioxypropylphenone, elemicin, 2,4,6-trimethoxy-1-[(1Z)-1-propenyl]benzene, exaltacin and pipermagine. For each region, Principal Component Analysis (PCA) has shown that there were quantitative differences between the compositions of the essential oils from each season. It was also found that the Northeast region was distinct from the others, with specific major compounds, which was confirmed by PCA and Hierarchical Cluster Analysis. The major compounds from the essential oils of the plant collected in the Northeast Region, which could not be identified by the AI, were isolated by Thin Layer Chromatography and identified by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. This is the first report of the presence of 2,4,6-trimethoxy-1-[(1Z)-1-propenyl]benzene and pipermagine in essential oils, and their AI were determined in this work, being 1629 and 1720, respectively. The antimicrobial activities showed that the most active essential oils were those from the Center-West and Northern regions, and the highest activities observed were against the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, with a minimal inhibitory growth (MIC) of 0.25 mg mL^{-1} by the essential oils from the plant collected in the Central-West Region in summer and autumn and in the Northern Region in autumn. All essential oils exhibited inhibition against the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, the most significant being by the essential oil from the plant collected in the Northeast Region in winter ($\text{MIC} = 0.25\text{ mg mL}^{-1}$).

Keywords: *Piper marginatum*. Essential oil. Seasonal variation. Regional variation. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – <i>Piper marginatum</i> Jacq. | 21 |
| FIGURA 2 – MARCADORES QUIMIOTAXONÔMICOS DA ESPÉCIE <i>P. marginatum</i> | 22 |
| FIGURA 3 – EXEMPLOS DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS | 23 |
| FIGURA 4 – CAMINHO DO MEVALONATO E DO METILERITRITOL PARA A FORMAÇÃO DOS MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS..... | 23 |
| FIGURA 5 – CAMINHO DO CHIQUIMATO PARA A FORMAÇÃO DO ÁCIDO CINÂMICO | 24 |
| FIGURA 6 – EXEMPLOS DE ARILPROPANOIDES | 25 |
| FIGURA 7 – ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 26 |
| FIGURA 8 – EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS REALIZADA EM APARELHO DE CLEVINGER MODIFICADO EM TRIPLICATA SIMULTÂNEA..... | 32 |
| FIGURA 9 – CONSTITUINTES IDENTIFICADOS EM TODAS AS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> | 37 |
| FIGURA 10 – ALGUNS DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE | 40 |
| FIGURA 11 – ESPECTRO DE MASSAS DA ELEMICINA OBTIDO NO GC-EM | 41 |
| FIGURA 12 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DA ELEMICINA | 41 |
| FIGURA 15 – CONSTITUINTES RESPONSÁVEIS PELA DIFERENCIAÇÃO DAS ESTAÇÕES PARA A REGIÃO CENTRO-OESTE | 44 |
| FIGURA 16 – ALGUNS DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE..... | 48 |
| FIGURA 17 – ESPECTRO DE MASSAS DO 3,4-METILENODIOXIPROPIOFENONA OBTIDO NO CG-EM | 48 |
| FIGURA 18 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DO 3,4-METILENODIOXIPROPIOFENONA | 49 |
| FIGURA 21 – CONSTITUINTES RESPONSÁVEIS PELA DIFERENCIAÇÃO DAS ESTAÇÕES PARA A REGIÃO NORTE | 51 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 22 – ALGUNS DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE | 54 |
| FIGURA 25 – CONSTITUINTES RESPONSÁVEIS PELA DIFERENCIAÇÃO DAS ESTAÇÕES PARA A REGIÃO NORDESTE | 57 |
| FIGURA 28 – DENDROGRAMA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 62 |
| FIGURA 29 – ESTRUTURA QUÍMICA DE A10-3 (EXALATACINA) | 63 |
| FIGURA 30 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA PARA A10-3 | 65 |
| FIGURA 31 – ESPECTRO DE MASSAS DA EXALATACINA OBTIDO NO CG-EM | 65 |
| FIGURA 32 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DA EXALATACINA... | 66 |
| FIGURA 33 – ESTRUTURA QUÍMICA DE A10-2B (2,4,6-TRIMETOXI-1-[(1E)-1-PROPENIL]BENZENO OU PIPERMARGINA | 67 |
| FIGURA 34 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA PARA A10-2B | 68 |
| FIGURA 35 – ESPECTRO DE MASSAS DA PIPERMARGINA OBTIDO NO CG-EM | 69 |
| FIGURA 36 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DA PIPERMARGINA..... | 69 |
| FIGURA 37 - ESTRUTURA QUÍMICA DE A10-2A (2,4,6-TRIMETOXI-1-[(1Z)-1-PROPENIL]BENZENO | 70 |
| FIGURA 38 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA PARA A10-2A | 71 |
| FIGURA 39 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NO CG-EM DO CONSTITUINTE A10-2A | 72 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS ÀS CLASSES DE CONSTITUINTES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE | 39 |
| GRÁFICO 2 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE..... | 42 |
| GRÁFICO 3 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE | 42 |
| GRÁFICO 4 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS ÀS CLASSES DE CONSTITUINTES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE..... | 47 |
| GRÁFICO 5 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE..... | 49 |
| GRÁFICO 6 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE..... | 50 |
| GRÁFICO 7 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS ÀS CLASSES DE COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE..... | 53 |
| GRÁFICO 8 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE..... | 55 |
| GRÁFICO 9 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE | 55 |
| GRÁFICO 10 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 60 |
| GRÁFICO 11 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 61 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 – LOCALIDADE E COORDENADAS GEOGRÁFICAS DAS COLETAS DE <i>P. marginatum</i> | 31 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – RENDIMENTOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 36 |
| TABELA 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO | 38 |
| TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO | 45 |
| TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO | 52 |
| TABELA 5 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA A10-3 | 63 |
| TABELA 6 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA A10-2B | 67 |
| TABELA 7 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA A10-2A | 70 |
| TABELA 8 – ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 73 |
| TABELA 9 – ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS (CONCENTRAÇÕES FUNGICIDA E BACTERICIDA MÍNIMAS) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | | |
|-----------------|---|---|
| δ | – | Deslocamento químico |
| °C | – | Grau Celsius |
| μL | – | Microlitro |
| μm | – | Micrômetro |
| AAH | – | Análise de Agrupamento Hierárquica |
| ACP | – | Análise de Componentes Principais |
| AgNO_3 | – | Nitrato de prata |
| ATCC | – | <i>American Type Collection Culture</i> |
| <i>B.</i> | – | <i>Bacillus</i> |
| C | – | Carbono |
| <i>C.</i> | – | <i>Candida</i> |
| CAPES | – | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CBM | – | Concentração Bactericida Mínima |
| CCDA | – | Cromatografia em Camada Delgada Analítica |
| CCDP | – | Cromatografia em Camada Delgada Preparativa |
| CDCl_3 | – | Clorofórmio deuterado |
| CFM | – | Concentração Fungicida Mínima |
| CG-EM | – | Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas |
| CIM | – | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | – | <i>Clinical and Laboratorial Standards Institute</i> |
| cm | – | Centímetro |
| CNPq | – | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CPQBA | – | Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas |
| d | – | Dupleto |
| dd | – | Duplo dupleto |
| DMAPP | – | Pirofosfato de dimetilalila |
| dq | – | Duplo quarteto |
| DQUI | – | Departamento de Química |
| <i>E.</i> | – | <i>Escherichia</i> |
| eV | – | Elétron-volt |

| | | |
|-----------|---|--|
| FPP | – | Pirofosfato de farnesila |
| g | – | Gramma |
| GPP | – | Pirofosfato de geranila |
| h | – | Hora |
| H | – | Hidrogênio |
| Hz | – | Hertz |
| HPLC | – | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) |
| IA | – | Índice Aritmético |
| IPP | – | Pirofosfato de isopentenila |
| <i>J</i> | – | Constante de acoplamento |
| LabRMN | – | Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear |
| m | – | Metro |
| mg | – | Miligrama |
| MHz | – | Megahertz |
| min | – | Minuto |
| mL | – | Mililitro |
| mm | – | Milímetro |
| MT | – | Mato Grosso |
| nm | – | Nanômetro |
| NaCl | – | Cloreto de sódio |
| NIST | – | <i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia) |
| <i>P.</i> | – | <i>Piper</i> |
| p. | – | Página |
| PA | – | Pará |
| PAL | – | Fenilalanina amônia-liase |
| PB | – | Paraíba |
| PC1 | – | Primeiro Componente Principal |
| PC2 | – | Segundo Componente Principal |
| PE | – | Pernambuco |
| PPGQ | – | Programa de Pós-Graduação em Química |
| ppm | – | Parte por milhão |

| | | |
|---------|---|---------------------------------------|
| RMN | – | Ressonância Magnética Nuclear |
| s | – | Singleto |
| S. | – | <i>Staphylococcus</i> |
| TANG | – | Tangará da Serra |
| TCC | – | <i>Tropical Culture Collection</i> |
| TMS | – | Tetrametilsilano |
| TPS | – | Terpeno sintase |
| TTC | – | Cloreto de trifenil tetrazólio |
| UFC | – | Unidade de formação de colônias |
| UFPR | – | Universidade Federal do Paraná |
| UNEMAT | – | Universidade do Estado do Mato Grosso |
| UNICAMP | – | Universidade Estadual de Campinas |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | FAMÍLIA Piperaceae Giseke..... | 20 |
| 1.2 | QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS | 22 |
| 1.3 | QUIMIOMETRIA | 27 |
| 2 | OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 3.1 | PROCEDIMENTOS GERAIS..... | 30 |
| 3.2 | COLETA, IDENTIFICAÇÃO E SECAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO..... | 31 |
| 3.3 | EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS..... | 31 |
| 3.4 | IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS | 32 |
| 3.5 | ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL | 33 |
| 3.6 | ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS..... | 33 |
| 3.7 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 34 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 4.1 | DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADAS..... | 63 |
| 4.1.1 | Determinação estrutural de A10-3 | 63 |
| 4.1.2 | Determinação de A10-2B | 66 |
| 4.1.3 | Determinação de A10-2A | 69 |
| 4.2 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 72 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 76 |
| | REFERÊNCIAS..... | 78 |
| | APÊNDICE 1 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. marginatum</i> COLETADA NAS REGIÕES CENTRO-OESTE, NORTE E NORDESTE NAS QUATRO ESTAÇÕES | 84 |
| | APÊNDICE 2 – CONSTITUINTES ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. marginatum</i> | 86 |
| | APÊNDICE 3 – ESPECTRO DE RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) DE A10-3 | 87 |
| | APÊNDICE 4 – ESPECTRO DE RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) DE A10-3..... | 88 |

| | |
|---|----|
| APÊNDICE 5 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-3 | 89 |
| APÊNDICE 6 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-3..... | 90 |
| APÊNDICE 7 – ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2B | 91 |
| APÊNDICE 8 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) DE A10-2B | 92 |
| APÊNDICE 9 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2B..... | 93 |
| APÊNDICE 10 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2B | 94 |
| APÊNDICE 11 – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) DE A10-2A ... | 95 |
| APÊNDICE 12 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) DE A10-2A .. | 96 |
| APÊNDICE 13 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2A..... | 97 |
| APÊNDICE 14 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2A | 98 |

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais antigos, a humanidade tem utilizado produtos naturais para diversas finalidades, como por exemplo na alimentação, no tratamento de doenças e sintomas e no controle de pragas (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Extratos de plantas podem apresentar constituintes fixos e voláteis e, dentro deste contexto, encontram-se os óleos voláteis, também chamados de óleos essenciais, os quais se apresentam como líquidos voláteis armazenados em células especiais das plantas, podendo localizar-se em flores, raízes, caules, folhas e sementes (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais têm sido utilizados por séculos como aditivos de alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos. Já foram estudados mais de 3000 óleos essenciais derivados de pelo menos 2000 plantas, sendo 300 de importância comercial (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Algumas famílias de plantas são conhecidas por possuírem espécies ricas em óleos essenciais, como Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, entre outras (BAŞER; DEMIRCI, 2007).

A extração das substâncias voláteis pode ser realizada através da extração com solventes, fluidos supercríticos, extração por arraste de vapor ou hidrodestilação, sendo esta última a mais comumente utilizada (BAKKALI et al., 2008; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Os óleos essenciais são considerados metabólitos secundários, sendo importantes no mecanismo de defesa da espécie vegetal, protegendo-a contra ataques de microrganismos e herbívoros, bem como atuando na atração de polinizadores (TAIZ; ZEIGER, 2010). Além das funções exercidas nas plantas, os metabólitos secundários vêm ganhando atenção por possuírem atividades biológicas. Estas atividades são relevantes, uma vez que questões como a utilização de conservantes químicos e a crescente resistência a agentes antimicrobianos estão se tornando preocupantes. A atividade biológica depende da estrutura química dos componentes, bem como da sua concentração (HAYEK; GYAWALI; IBRAHIM, 2013). Dentre algumas atividades biológicas apresentadas pelos óleos essenciais, destacam-se antibacteriana, antiparasitária, inseticida, antiviral, antifúngica e antioxidante (CARSON; HAMMER, 2011).

Os óleos voláteis correspondem a aproximadamente 1% da massa úmida da planta, e diversos fatores influenciam no seu rendimento e composição, como variação genética, nutrição da planta, estresse durante o seu crescimento ou maturação, localização geográfica, clima, variações do tempo, processo de secagem e armazenamento após a coleta (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Neste sentido, a definição do período em que o material botânico é coletado é de grande relevância, uma vez que a produção dos metabólitos secundários pela planta depende de fatores ambientais que variam de acordo com a sazonalidade, como, por exemplo, precipitação, temperatura, incidência solar e ataque de patógenos. Além disso, óleos essenciais de uma mesma espécie de plantas coletadas em regiões geográficas diferentes podem apresentar diferenças, determinando a existência de quimiotipos ou raças químicas. Isto se deve ao fato da planta se adaptar às diferenças de cada região particular, como diferentes altitudes, solos, exposição solar, entre outros fatores (FIGUEIREDO et al., 2008).

1.1 FAMÍLIA Piperaceae Giseke

A família Piperaceae Giseke engloba cinco gêneros, entre os quais se destaca o gênero *Piper* L., o mais abundante, possuindo cerca de 2.000 espécies localizadas nas regiões tropicais e subtropicais (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). Espécies do gênero *Piper* estão amplamente distribuídas na América do Sul, com 292 espécies ocorrendo no Brasil (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2010).

Além da importância comercial da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), outras espécies do gênero *Piper* também são estudadas por possuírem atividades biológicas (KRINSKI; FOERSTER; DESCHAMPS, 2018; PERIGO et al., 2016; SILVA et al., 2017). Os óleos essenciais das espécies de *Piper* são compostos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos, contendo também arilpropanoides em maior frequência que em outras famílias. Os rendimentos e os seus constituintes majoritários dependem principalmente da região geográfica e de fatores ambientais, estando muitas vezes relacionada aos diferentes quimiotipos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SILVA et al., 2017).

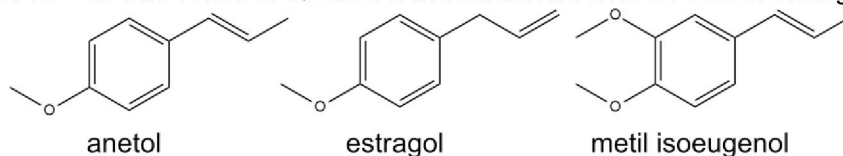
A espécie *Piper marginatum* Jacq. (FIGURA 1) foi descrita pela primeira vez em 1781, tendo sido coletada na América Central e América do Sul. No Brasil, sua presença já foi observada em todas as regiões. O arbusto tem sido utilizado por comunidades indígenas e na medicina popular para diversos fins, tais como para alívio de problemas gastrointestinais, para alívio de dor, como hemostático e antimicrobiano (BRÚ; GUZMAN, 2016; MORAES et al., 2014).

FIGURA 1 – *Piper marginatum* Jacq.



FONTE: TEPE (2013).

Há grandes variações na composição química no óleo essencial de *P. marginatum*, que são atribuídas principalmente às diferenças no ambiente e no clima. Segundo Brú e Guzman (2016), esta espécie possui marcadores quimiotaxonômicos, metabólitos secundários específicos não encontrados em outras espécies de *Piper*, como anetol, estragol e metil isoeugenol (FIGURA 2). No entanto, alguns autores não observaram a presença de todos estes compostos em seus óleos essenciais. Por exemplo, Silva et al. (2016) não encontraram nenhum destes compostos nos óleos essenciais estudados, enquanto Jaramillo-Colorado et al. (2015) verificaram a presença do estragol e do anetol. Moraes et al. (2014) observaram a presença do metil isoeugenol, enquanto Andrade et al. (2008) verificaram a presença somente do anetol.

FIGURA 2 – MARCADORES QUIMIOTAXONÔMICOS DA ESPÉCIE *P. marginatum*

FONTE: A autora (2018).

Algumas atividades que os óleos essenciais desta espécie possuem incluem antifúngica, larvicida, antioxidante, repelente e fagoinibidora (AUTRAN et al., 2009; JARAMILLO-COLORADO et al., 2015; SANTANA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

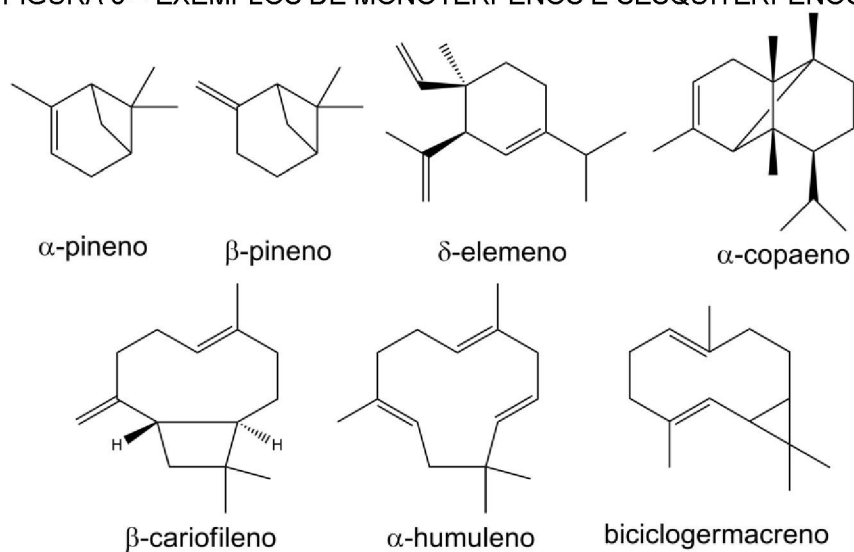
1.2 QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais podem ser compostos por até 100 constituintes, apresentando uma química complexa, com a presença de diferentes classes, normalmente hidrocarbonetos e seus derivados oxigenados, predominando os terpenos e arilpropanoides (CARSON; HAMMER, 2011).

Os terpenos são o maior grupo de compostos naturais, com cerca de 30.000 estruturas conhecidas. Originalmente eles são vistos como polímeros do isopreno (na sua forma ativa pirofosfato de isopentenila e pirofosfato de dimetilalila) unidos, normalmente, por cabeça-cauda. Eles são classificados pelo número de unidades de isopreno das quais eles são derivados: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀), derivados de 1, 2, 3 e 4 unidades de isopreno, respectivamente. Monoterpenos são os compostos mais comumente encontrados nos óleos essenciais, seguidos dos sesquiterpenos (FIGURA 3) (CARSON; HAMMER, 2011; DEWICK, 2002).

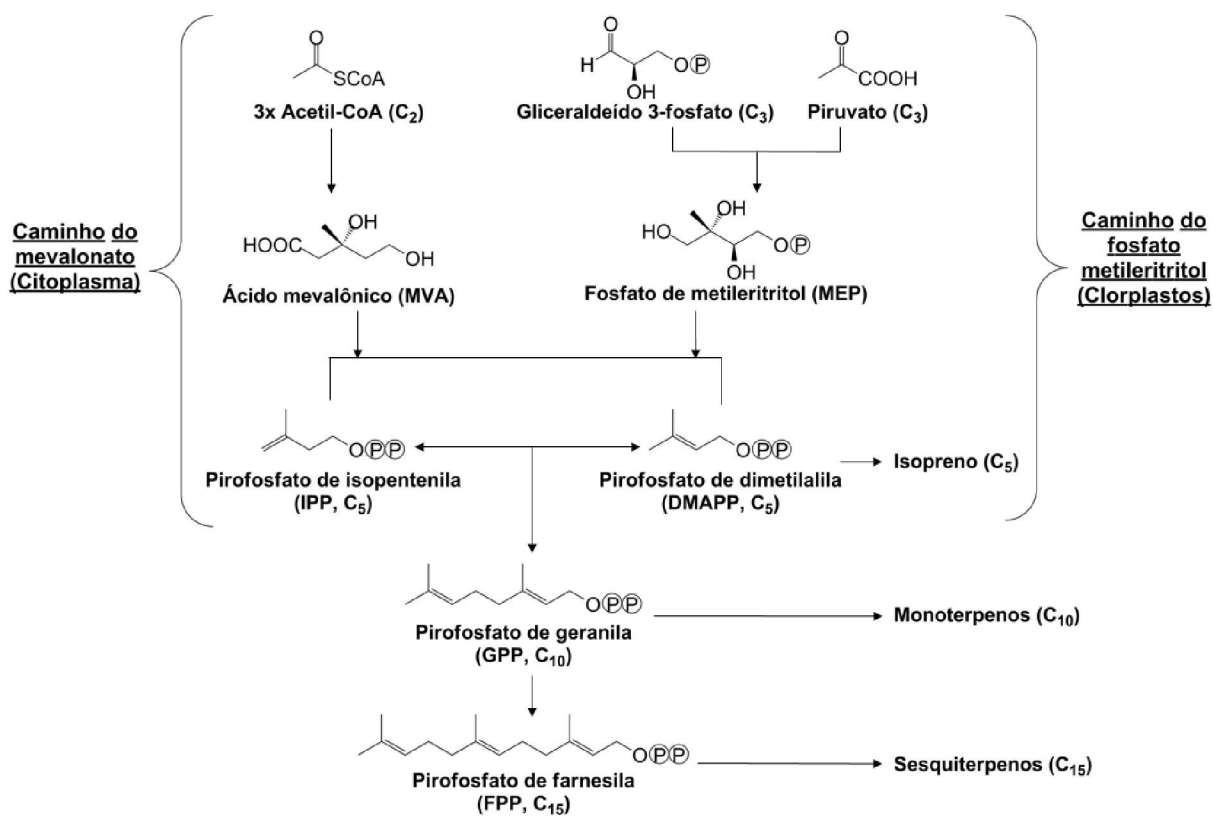
A biossíntese dos terpenos (FIGURA 4) ocorre por dois caminhos distintos: o caminho do mevalonato (no citoplasma) e o caminho do não-mevalonato ou do metileritritol (nos cloroplastos). Ambos os caminhos têm em comum os precursores pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), que após condensação, geram pirofosfato de geranila (GPP), precursor imediato dos monoterpenos. A condensação do IPP e do GPP resulta no pirofosfato de farnesila (FPP), precursor imediato dos sesquiterpenos (BAŞER; DEMIRCI, 2007).

FIGURA 3 – EXEMPLOS DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 4 – CAMINHO DO MEVALONATO E DO METILERITRITOL PARA A FORMAÇÃO DOS MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS

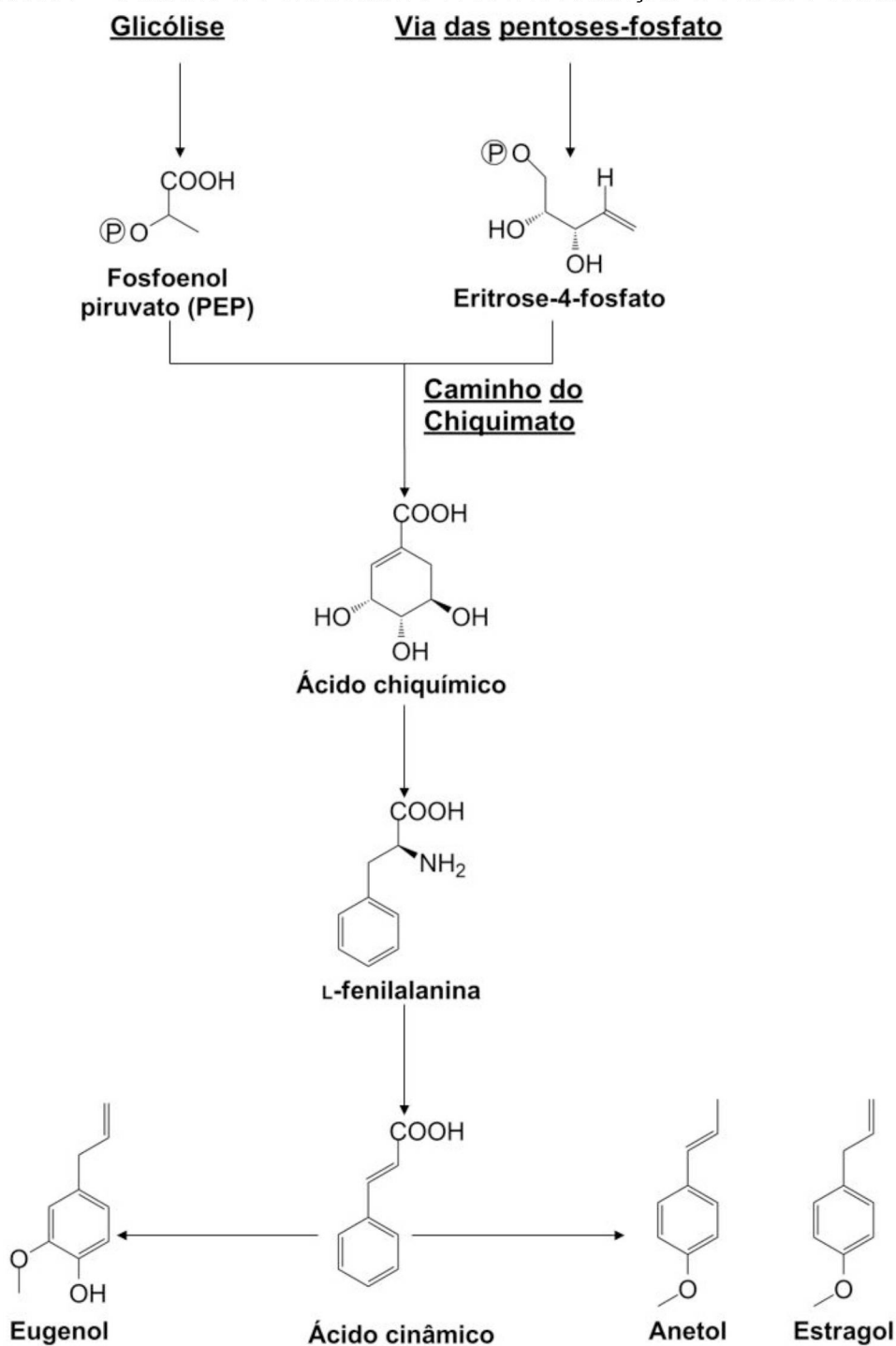


FONTE: Adaptada de TAIZ; ZEIGER (2010).

Os arilpropanoides são biossintetizados pelo caminho do ácido chiquímico (FIGURA 5), que ocorre apenas em microrganismos e plantas, sendo responsável pela síntese de diversos compostos fenólicos em plantas. A biossíntese inicia-se com a glicose, produzindo o aminoácido L-fenilalanina, que ao ter sua função amina

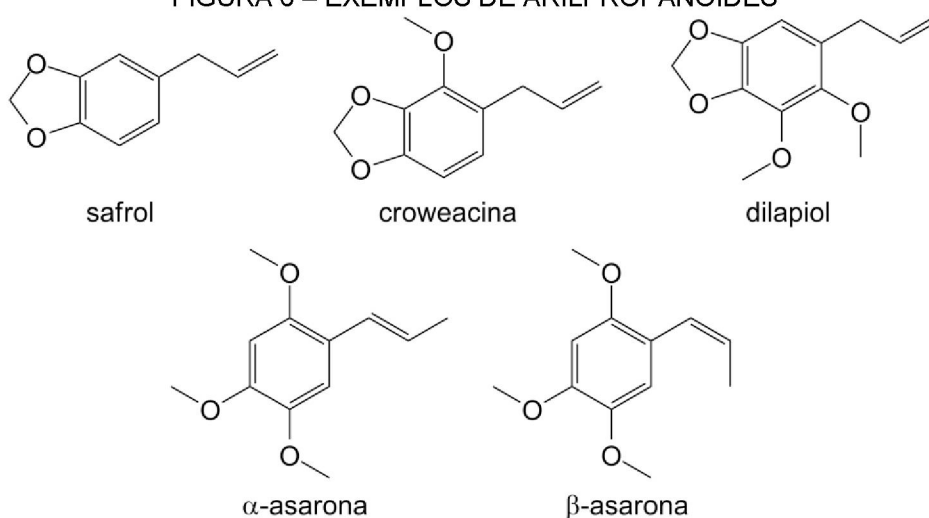
removida pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), transforma-se no ácido cinâmico. Este, por sua vez, com ação de várias enzimas, origina uma grande variedade de arilpropanoides, que estão presentes em óleos essenciais (FIGURA 6) (BAŞER; DEMIRCI, 2007; CARSON; HAMMER, 2011).

FIGURA 5 – CAMINHO DO CHIQUIMATO PARA A FORMAÇÃO DO ÁCIDO CINÂMICO



FONTE: Adaptada de SANGWAN et al. (2001).

FIGURA 6 – EXEMPLOS DE ARILPROPANOIDES



FONTE: A autora (2018).

Para a espécie *P. marginatum*, objeto deste trabalho, há diversos estudos que mostram uma grande variação na composição e rendimento dos óleos essenciais. No estudo de Silva et al. (2016), o óleo essencial de partes aéreas (folhas e ramos herbáceos) coletadas na Amazônia apresentou-se majoritariamente constituído por arilpropanoides (42%), seguido de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (17,6%), sesquiterpenos oxigenados (17,5%), hidrocarbonetos monoterpênicos (10,3%) e monoterpênos oxigenados (1,6%), sendo o constituinte majoritário o arilpropanoide 3,4-metilenodioxipropiofenona (21,8%) (FIGURA 7).

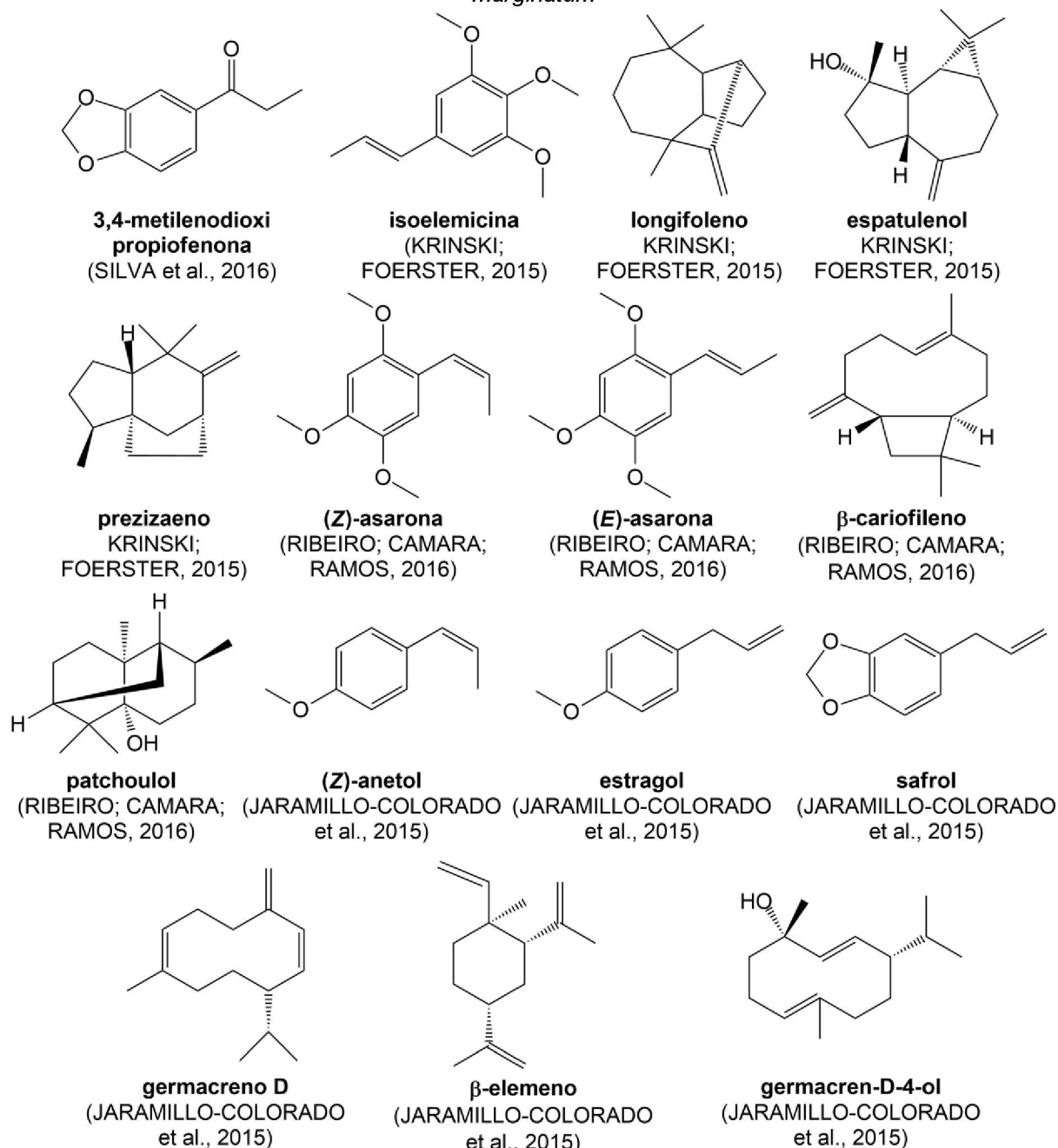
Krinski e Foerster (2016) mostraram que o óleo essencial de folhas coletadas em Novo Progresso (PA) era constituído principalmente pelo arilpropanoide isoelemicina (10,0%) e pelos sesquiterpenos espatulenol (9,3%), prezizaeno (7,6%) e longifoleno (2,8%).

Ribeiro, Camara e Ramos (2016) identificaram quatro constituintes majoritários no óleo essencial de folhas coletadas em Recife (PE), dois arilpropanoides: (*Z*)-asarona (30,4%) e (*E*)-asarona (6,4%) e dois sesquiterpenos: β-cariofileno (16,0%) e patchoulol (7,5%).

Jaramillo-Colorado et al. (2015) compararam óleos essenciais de folhas coletadas em duas regiões da Colômbia, Acandi e Turbaco. Eles verificaram que o óleo essencial extraído de materiais botânicos coletados em Acandi apresentou rendimento de 0,67% e era constituído principalmente por arilpropanoides, sendo o (*Z*)-anetol o constituinte majoritário (46,3%), seguido pelo estragol (28,9%) e safrol (9,0%). Já o óleo essencial da espécie coletada em Turbaco apresentou rendimento

cerca de 4 vezes menor (0,15%) e apresentava-se constituído majoritariamente de sesquiterpenos, sendo o germacreno D o constituinte majoritário (36,6%), seguido pelo β -elemeno (12,6%) e germacren-D-4-ol (5,4%).

FIGURA 7 – ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*



FONTE: A autora (2018).

Andrade et al. (2008) analisaram os óleos essenciais de folhas coletadas em 22 regiões diferentes e verificaram a existência de sete quimiotipos. Moraes et al. (2014) avaliaram a variação circadiana do óleo essencial da planta coletada em

Recife (PE) e verificaram não haver diferenças qualitativas entre as amostras, apenas quantitativas.

Apesar de vários estudos da composição dos óleos essenciais de *P. marginatum*, inclusive estudos da variação circadiana e regional, não há relatos na literatura acerca de estudos sobre a variação sazonal da composição química dos óleos essenciais da espécie coletada nas regiões selecionadas para este trabalho.

1.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como a área da química que, através do uso de métodos matemáticos e computacionais, planeja e seleciona procedimentos e experimentos visando à obtenção do máximo de informação química a partir de dados químicos multivariados (OTTO, 2016).

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um método frequentemente utilizado na quimiometria, sendo base para métodos de reconhecimento de padrões, classificação, calibração multivariada e utilização para a verificação de similaridade entre amostras (SOUZA; POPPI, 2012). Outro método utilizado é a Análise de Agrupamento Hierárquica (AAH), que corresponde a uma série de procedimentos estatísticos utilizados para classificar objetos pelas semelhanças e diferenças entre eles, gerando uma matriz de semelhanças e diferenças, que é visualizada em um dendrograma.

Neste estudo, o objetivo da análise estatística foi verificar a similaridade e a diferença entre os óleos essenciais com base no perfil da sua composição química, identificando quais metabólitos são responsáveis pela variação. Desta maneira, devido ao grande número de substâncias, a utilização dos métodos ACP e AAH são relevantes para a verificação da existência de semelhanças e diferenças entre as amostras de diferentes regiões e de variações em função das estações do ano.

Moraes et al. (2014) verificaram a variação circadiana da composição de óleos essenciais de *Piper marginatum* e, através das análises de ACP e AAH, observaram uma variação quantitativa significativa na composição dos óleos, resultando em sete quimiotipos e dois grandes grupos, um com predominância de arilpropanoides e outro de sesquiterpenos.

Dentro deste contexto, este trabalho apresentou como objetivo avaliar a variação da composição química dos óleos essenciais de *Piper marginatum*

coletadas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil nas quatro estações do ano. Além disso, utilizaram-se análises quimiométricas para analisar os dados das amostras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da sazonalidade e da regionalidade na composição química dos óleos essenciais de *Piper marginatum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os óleos essenciais das folhas de *P. marginatum* através da hidrodestilação;
- Identificar a composição química dos óleos essenciais através de Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Isolar compostos majoritários por Cromatografia em Camada Delgada Analítica e Preparativa (CCDA e CCDP) e identificá-los pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C ;
- Avaliar os óleos extraídos em função da sazonalidade e regionalidade;
- Realizar análises quimiométricas (ACP e AAH) para verificar estatisticamente a existência de similaridade entre as composições dos óleos essenciais;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

As análises de CG-EM foram realizadas no Cromatógrafo Gasoso-Espectrômetro de Massas Shimadzu GCMS-TQ8040 equipado com um detector de ionização por elétrons (70 eV, 200 °C) e uma coluna capilar de sílica fundida Shimadzu SH-Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL min⁻¹. As amostras foram diluídas a 1% (volume/volume) em diclorometano HPLC (J. T. Baker) e 1,0 µL foi injetado em razão de split 1:90 a 250 °C. A temperatura da coluna foi programada de 60 °C a 250 °C com aquecimento de 3 °C min⁻¹.

As análises de CCDP foram realizadas em placas de vidro de tamanho de 20 cm x 20 cm e recobertas por gel de sílica 60 com indicador de fluorescência F-254 (Vetec) com espessura de 1 mm. As análises de CCDA foram realizadas em cromatofolhas de alumínio recobertas por gel de sílica 60, com indicador de fluorescência F-254, tamanho de 20 cm x 20 cm e espessura de 200 µm (SiliCycle) impregnadas com AgNO₃ (Synth). Nas análises cromatográficas, foram utilizados os solventes de grau analítico diclorometano (Dipa), éter de petróleo (Neon) e acetato de etila (CARLO ERBA).

As análises de RMN de ¹H e ¹³C unidimensionais e bidimensionais foram realizadas nos Espectrômetros de RMN Bruker DPX 200, Avance 400 e Ascend 600, localizados no LabRMN (DQUI-UFPR) e no Centro de RMN do Departamento de Bioquímica (UFPR). Os equipamentos operaram a 4,7, 9,4 e 14,1 Tesla e observaram os núcleos de ¹H a 200, 400 e 600 MHz e de ¹³C a 50, 100 e 150 MHz, respectivamente. As amostras foram diluídas em CDCl₃ com TMS como padrão interno de referência (Sigma-Aldrich). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm em relação ao TMS (δ = 0 ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz.

As análises antimicrobianas foram realizadas na Divisão de Microbiologia (CPQBA-UNICAMP) em colaboração com a Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte. Para os ensaios, foram utilizados cloranfenicol (Sigma-Aldrich), nistatina (Merck) e TTC (Merck).

3.2 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E SECAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico de *Piper marginatum* foi coletado pelo Dr. Diones Krinski em três regiões do Brasil nas quatro estações do ano (QUADRO 1). Três exsicatas foram depositadas no Herbário TANG (UNEMAT).

QUADRO 1 – LOCALIDADE E COORDENADAS GEOGRÁFICAS DAS COLETAS DE *P. marginatum*

| Região | Município | Coordenadas | Altitude | Código do Herbário |
|--------------|-----------------------|--------------------------------|----------|--------------------|
| Centro-Oeste | Tangará da Serra (MT) | 14°37'38.1" S 58°33'01.2" W | 400 m | TANG 4644 |
| Norte | Novo Progresso (PA) | 7°07'43.6" S 55°23'22.1" W | 231 m | TANG 4643 |
| Nordeste | João Pessoa (PB) | 7°07'07.0"S 34° 53'32.9" W | 95 m | TANG 4645 |

FONTE: A autora (2018).

Após a coleta, a planta foi secada à temperatura ambiente e, posteriormente, em estufa de ar circulante a 40 °C até massa constante.

3.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia do Setor de Ciências Agrárias (UFPR). As folhas secas e moídas do material vegetal foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 4 h (100 g em aproximadamente 1500 mL de água destilada) (FIGURA 8). A extração foi realizada em triplicata. Em seguida, o óleo essencial foi coletado, seco e mantido em *vials* no freezer até análise.

FIGURA 8 – EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS REALIZADA EM APARELHO DE CLEVINGER MODIFICADO EM TRIPLICATA SIMULTÂNEA



FONTE: A autora (2018).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados a partir dos espectros obtidos por CG-EM, com base no Índice Aritmético (IA) determinado através da Equação (1) (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), utilizando uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados contendo de 8 a 24 átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas. Através do programa interpretativo automático, os espectros de massas dos constituintes detectados foram comparados com os espectros existentes na biblioteca de massas NIST 14 (NIST, Gaithersburg, EUA) e por análise visual comparativa com os espectros de massas da literatura (ADAMS, 2007) e da base de dados NIST WebBook (NIST, 2018). As concentrações dos constituintes foram obtidas através da normalização das áreas dos picos e foram identificados os picos com concentração superior a 0,1%.

$$IA = 100 \left[z + \frac{tr(x) - tr(z)}{tr(z + 1) - tr(z)} \right] \quad (1)$$

Sendo:

z: número de átomos de carbono do hidrocarboneto padrão;

tr(x): tempo de retenção do analito, cujo valor encontra-se entre tr(z) e tr(z+1);

tr(z): tempo de retenção do hidrocarboneto padrão com z átomos de carbono;

tr(z+1): tempo de retenção do hidrocarboneto padrão com z+1 átomos de carbono.

3.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL

O isolamento dos constituintes do óleo essencial foi realizado por CCDP e CCDA. Primeiramente, 30 mg do óleo essencial de *P. marginatum* coletada em João Pessoa, PB (Região Nordeste) no verão foram solubilizados em diclorometano e aplicados em uma placa de vidro recoberta por gel de sílica. Como fase móvel utilizou-se éter de petróleo e acetato de etila (98:2). A placa cromatográfica foi eluída duas vezes até a separação das substâncias de interesse. As frações foram reveladas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm), isoladas, solubilizadas em diclorometano e filtradas a vácuo. Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo à temperatura não superior a 50 °C. Desta forma, obteve-se duas frações: A10-2 e A10-3.

A fração A10-2 foi repurificada em uma cromatofolha de alumínio recoberta por gel de sílica impregnada com AgNO₃. Para a impregnação, foi utilizada uma solução aquosa de AgNO₃ 10% (massa/volume), na qual a cromatofolha foi mergulhada por 15 min e em seguida secada em estufa a 40 °C. Como fase móvel utilizou-se diclorometano e acetato de etila (85:15) e a placa foi eluída uma vez. As frações foram isoladas, solubilizadas em diclorometano e filtradas a vácuo. Foram recuperadas duas frações: A10-2A e A10-2B. Em seguida, o solvente foi removido em evaporador rotativo à temperatura não superior a 50 °C.

Os constituintes isolados nas frações **A10-3**, **A10-2B** e **A10-2A** foram identificados pelos espectros de RMN de ¹H e ¹³C unidimensionais e bidimensionais.

3.6 ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS

Os dados obtidos da composição química dos óleos essenciais foram organizados em planilhas de 12 linhas por 63 colunas, nas quais as linhas correspondiam às amostras de óleos essenciais de cada uma das regiões (Centro-Oeste, Norte e Nordeste) e estações do ano e as colunas às concentrações dos

constituintes identificados. Foram realizadas as análises para cada região individualmente, bem como para todas as regiões em conjunto. Aplicaram-se dois métodos quimiométricos para análise dos dados: ACP e AAH, sendo realizado o devido tratamento dos resultados com o pacote PLS_toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operado no *software* Matlab® v.7.0.1 (MathWorkInc®).

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os óleos essenciais de *P. marginatum* foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana contra sete microrganismos: *Candida albicans* (TCC 776), *Bacillus subtilis* (TCC 2576), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Estes microrganismos foram obtidos da ATCC e TCC, e são sistematicamente usados como parte de um programa de triagem direcionado para a identificação de produtos naturais com potencial a ser explorado como novas drogas antimicrobianas.

A subcultura dos microrganismos foi realizada durante a noite a 36 °C usando Ágar Nutritivo para as bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans*. A preparação dos inóculos para os ensaios foi realizada por diluição de uma massa de células raspadas em solução de NaCl (0,85%), ajustado à escala de McFarland no 0,5 e confirmado pela leitura em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias ou 530 nm para leveduras.

As suspensões de células foram diluídas para 10^3 e 10^4 UFC mL⁻¹ para utilização nos ensaios de atividade das bactérias e das leveduras, respectivamente. Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados de acordo com a CLSI (2008, 2012), utilizando o caldo Muller-Hinton (bactérias) ou caldo RPMI-1640 (*C. albicans*) sobre uma placa de ensaio de cultura de tecidos (96 poços). A solução estoque dos óleos essenciais foi diluída e transferida para o primeiro poço, e foram feitas diluições em série de modo que as concentrações obtidas foram na faixa de 1,0 a 0,015 mg mL⁻¹. Como controle de referência foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e nistatina com concentração na faixa de 0,25 a 0,002 mg mL⁻¹. O inóculo foi adicionado a todos os poços e as placas foram incubadas a 36 °C durante 48 h. Cada concentração foi realizada em triplicata. A atividade antibacteriana foi detectada por adição de 20 µL de solução de 0,5% de

TTC aquoso. A CIM foi definida como a concentração mínima da amostra que inibiu o crescimento visível, tal como indicado por coloração TTC (células mortas não são coradas pelo TTC). No caso da levedura *C. albicans*, após o período de incubação, verificou-se a mudança na coloração do meio RPMI-1640 passando de rosa (cor original) para amarelo. A mudança indica uma acidificação do meio pelo crescimento dos microrganismos.

As concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (CBM e CFM, respectivamente) foram determinadas por meio de plaqueamento de 10 µL do material contido no poço correspondente ao da CIM e dos três poços subsequentes de maior concentração, nos meios sólidos adequados para cada microrganismo. Posteriormente, as placas contendo bactérias e leveduras foram incubadas de acordo com a temperatura determinada para cada microrganismo. As CBM e CFM foram definidas como as concentrações mínimas capazes de inibir totalmente o crescimento bacteriano ou fúngico (99,9%) nos meios de cultura sólidos específicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo dos óleos essenciais das folhas de *P. marginatum* foi realizado considerando a sazonalidade e a regionalidade (Regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste) da coleta das plantas.

Os rendimentos das extrações dos óleos essenciais (TABELA 1) foram calculados a partir da massa de óleo essencial obtido em relação à massa total de folhas secas utilizadas na extração (100 g). Os maiores rendimentos obtidos entre todas as amostras foram os da Região Nordeste e do inverno e primavera da Região Norte.

TABELA 1 – RENDIMENTOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*

| Região | Centro-Oeste | Norte | Nordeste |
|-----------|--------------|-----------|-----------|
| Verão | 0,29±0,05 | 0,55±0,09 | 1,20±0,11 |
| Outono | 0,15±0,01 | 0,44±0,02 | 1,74±0,07 |
| Inverno | 0,21±0,04 | 0,90±0,12 | 0,88±0,14 |
| Primavera | 0,35±0,01 | 0,87±0,15 | 0,94±0,20 |

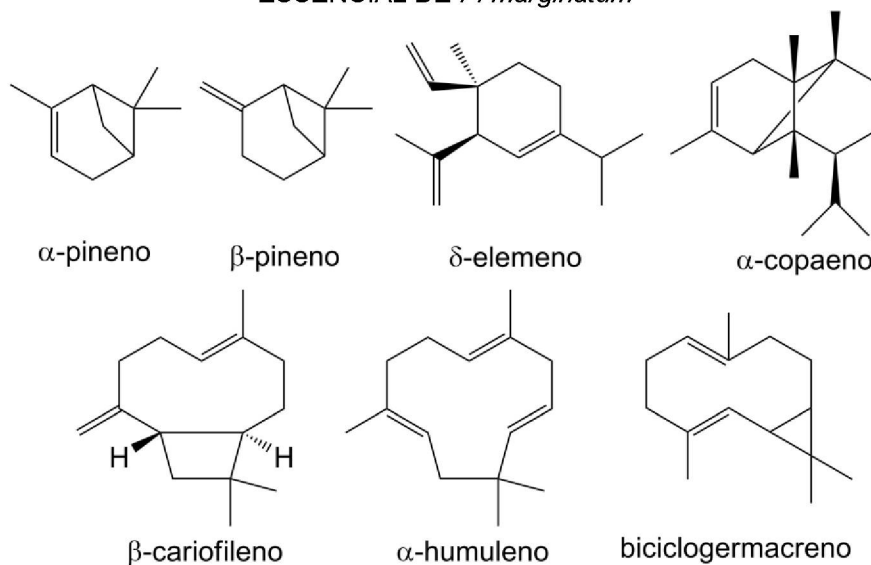
FONTE: A autora (2018).

A diferença nos rendimentos pode ser justificada pela sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, ciclo de atividade de polinizadores, temperatura, disponibilidade hídrica, incidência de luminosidade, nutrientes, altitude, poluição, estímulos mecânicos ou ataque de patógenos e incidência de doenças ou pragas (FIGUEIREDO et al., 2008; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Os rendimentos obtidos encontram-se dentro dos valores já reportados na literatura para óleos essenciais de folhas de *P. marginatum*, que variam de 0,02% a 3,6% (AUTRAN et al., 2009; JARAMILLO-COLORADO et al., 2015; MORAES et al., 2014; SILVA et al., 2016; SOUTO et al., 2012).

As TABELAS 2 (p. 38 e 39), 3 (p. 45 e 46) e 4 (p. 52 e 53) mostram a composição química dos óleos essenciais de *P. marginatum* coletadas nas Regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, respectivamente, nas quatro estações do ano. Ao todo, foram identificados 63 constituintes, pertencentes às classes de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpênicos oxigenados e arilpropanóides (APÊNDICE 1, p. 84 e 85). Os constituintes α -pineno, β -pineno, δ -elemeno, α -copaeno, β -cariofileno, α -

humuleno (α -cariofileno) e biciclogermacreno encontraram-se presentes em todas as amostras (FIGURA 9).

FIGURA 9 – CONSTITUINTES IDENTIFICADOS EM TODAS AS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum*



FONTE: A autora (2018).

Nas amostras da Região Centro-Oeste foram identificados 50 constituintes. O perfil químico dos óleos essenciais de *P. marginatum* coletadas no verão e no outono são muito semelhantes, sendo ambos compostos principalmente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (aproximadamente 50%), seguidos por sesquiterpenos oxigenados (cerca de 30%) e arilpropanoides (em média 10%), possuindo hidrocarbonetos monoterpênicos em pequena quantidade (por volta de 5%) e não apresentando monoterpênicos oxigenados (TABELA 2, GRÁFICO 1).

O óleo essencial da espécie coletada no inverno é composto predominantemente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (42%) e perfil quantitativo semelhante para hidrocarbonetos monoterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e arilpropanoides (em média 19%). Já o óleo essencial do material botânico coletado na primavera possui quantidade semelhante de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e arilpropanoides (cerca de 30%), apresentando hidrocarbonetos monoterpênicos em menor concentração (15%) e monoterpênicos oxigenados em concentração inferior a 1%.

Observa-se, de uma maneira geral, em todas as estações, que à medida que os hidrocarbonetos sesquiterpênicos diminuem, os arilpropanoides aumentam, e

vice-versa. Os hidrocarbonetos monoterpênicos também apresentam esta relação com os hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO (continua)

| Constituintes | IA ^a | IA ^b | Amostras ^c | | | |
|--|-----------------|-------------------|-----------------------|------------|------------|------------|
| | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| α-tujeno | 924 | 924 | | | | 0,10±0,17 |
| α-pineno | 933 | 932 | 0,40±0,18 | 0,49±0,16 | 1,04±0,03 | 0,87±0,31 |
| sabineno | 973 | 969 | | | | 0,14±0,12 |
| β-pineno | 976 | 974 | 0,27±0,13 | 0,39±0,09 | 0,72±0,02 | 0,67±0,11 |
| mirreno | 992 | 988 | | | 0,44±0,05 | 0,32±0,06 |
| α-felandreno | 1005 | 1002 | 0,54±0,14 | | 0,83±0,14 | 2,23±0,68 |
| α-terpineno | 1017 | 1014 | 0,43±0,20 | | 0,71±0,15 | 1,35±0,39 |
| p-cimeno | 1025 | 1020 | 1,02±0,40 | 0,99±0,09 | 3,58±0,37 | 2,55±2,22 |
| silvestreno | 1029 | 1025 | 0,31±0,15 | 0,11±0,20 | 0,71±0,09 | 1,04±0,21 |
| (Z)-β-ocimeno | 1038 | 1032 | 0,70±0,23 | 0,30±0,13 | 2,43±0,17 | |
| (E)-β-ocimeno | 1048 | 1044 | 0,80±0,27 | 0,19±0,19 | 3,52±0,46 | |
| γ-terpineno | 1059 | 1054 | 1,22±0,33 | 0,62±0,23 | 2,20±0,40 | 3,84±0,64 |
| p-menta-2,4(8)-dieno (isoterpinoleno) | 1089 | 1085 | | | 1,23±0,30 | 2,09±0,45 |
| terpinoleno | 1089 | 1086 | 0,69±0,13 | 0,27±0,12 | | |
| linalol | 1101 | 1095 | | | 0,48±0,08 | 0,28±0,26 |
| δ-elemeno | 1338 | 1335 | 0,66±0,10 | 0,99±0,13 | 0,91±0,06 | 0,54±0,24 |
| ciclosativeno | 1365 | 1369 | 0,28±0,09 | 0,64±0,08 | 0,24±0,21 | 0,43±0,10 |
| α-copaeno | 1376 | 1374 | 5,73±0,60 | 7,06±0,71 | 4,08±0,18 | 4,41±1,28 |
| β-bourboneno | 1385 | 1387 | 0,89±0,11 | 0,91±0,28 | 1,55±0,05 | 0,88±0,30 |
| β-cubebeno | 1391 | 1387 | | 0,25±0,15 | | 0,10±0,17 |
| isolongifoleno | 1391 | 1389 | 0,38±0,05 | | | |
| β-elemeno | 1393 | 1389 | 0,49±0,07 | 0,95±0,11 | | 0,28±0,25 |
| metil eugenol | 1409 | 1403 | 0,52±0,14 | | 0,55±0,04 | 0,82±0,14 |
| β-cariofileno | 1419 | 1417 | 10,87±0,73 | 9,26±0,45 | 9,78±0,51 | 7,99±2,19 |
| β-copaeno | 1429 | 1430 | 0,66±0,10 | 1,08±0,16 | 0,73±0,01 | 0,82±0,25 |
| aromadendreno | 1439 | 1439 | | 0,16±0,15 | 0,34±0,01 | |
| α-humuleno | 1454 | 1452 | 1,12±0,02 | 1,27±0,09 | 1,10±0,03 | 0,92±0,25 |
| allo-aromadendreno | 1461 | 1458 | | 1,14±0,10 | | |
| α-neocalitropseno | 1473 | 1474 | 0,53±0,03 | 0,84±0,05 | 0,60±0,07 | 0,37±0,32 |
| γ-muroleno | 1477 | 1478 | 0,72±0,07 | 1,65±0,19 | 0,73±0,07 | 0,79±0,23 |
| germacreno D | 1481 | 1484 | 3,41±0,17 | 7,32±0,26 | 3,44±0,04 | 0,73±0,15 |
| β-selineno (β-eudesmeno) | 1486 | 1489 | 1,29±0,08 | 2,89±0,16 | 0,99±0,05 | 1,35±0,43 |
| biciclogermacreno | 1497 | 1500 | 12,65±0,54 | 10,95±0,20 | 11,52±0,32 | 2,64±0,56 |
| α-muroleno | 1501 | 1500 | 1,81±0,09 | 2,62±0,34 | 1,36±0,01 | 1,17±0,29 |
| α-bulneseno (δ-guaieno) | 1506 | 1509 | 0,27±0,28 | 1,14±0,16 | 0,33±0,29 | 0,31±0,35 |
| γ-cadineno | 1513 | 1513 | 1,43±0,04 | 1,54±0,18 | 1,12±0,07 | |
| miristicina | 1515 | 1517 | 2,80±0,67 | 1,26±0,16 | 8,83±0,46 | 8,61±0,61 |
| δ-cadineno | 1525 | 1522 | 4,92±0,28 | 3,94±0,08 | 3,52±1,13 | 1,00±0,36 |
| 3,4-metilenodioxo propiofenona | 1534 | 1545 ^d | 3,97±0,48 | 2,23±2,02 | 4,84±0,46 | 7,00±2,64 |
| elemicina | 1560 | 1555 | 3,93±0,40 | 4,58±0,47 | 4,27±0,08 | 11,07±2,34 |
| (E)-nerolidol | 1565 | 1561 | 2,87±0,15 | 2,11±0,12 | 2,41±0,41 | 2,27±0,24 |
| espatulenol | 1578 | 1577 | 9,72±0,61 | 11,32±0,41 | 8,25±0,14 | 12,81±0,88 |
| óxido de cariofileno | 1584 | 1582 | 3,94±0,65 | 6,25±0,06 | 2,95±0,59 | 8,26±0,80 |
| dilapiol | 1627 | 1620 | 1,09±0,09 | 0,92±0,06 | 0,78±0,08 | |
| isoespatulenol | 1631 | 1628 ^e | 3,34±0,10 | 3,31±0,70 | 2,33±0,16 | 3,19±0,38 |

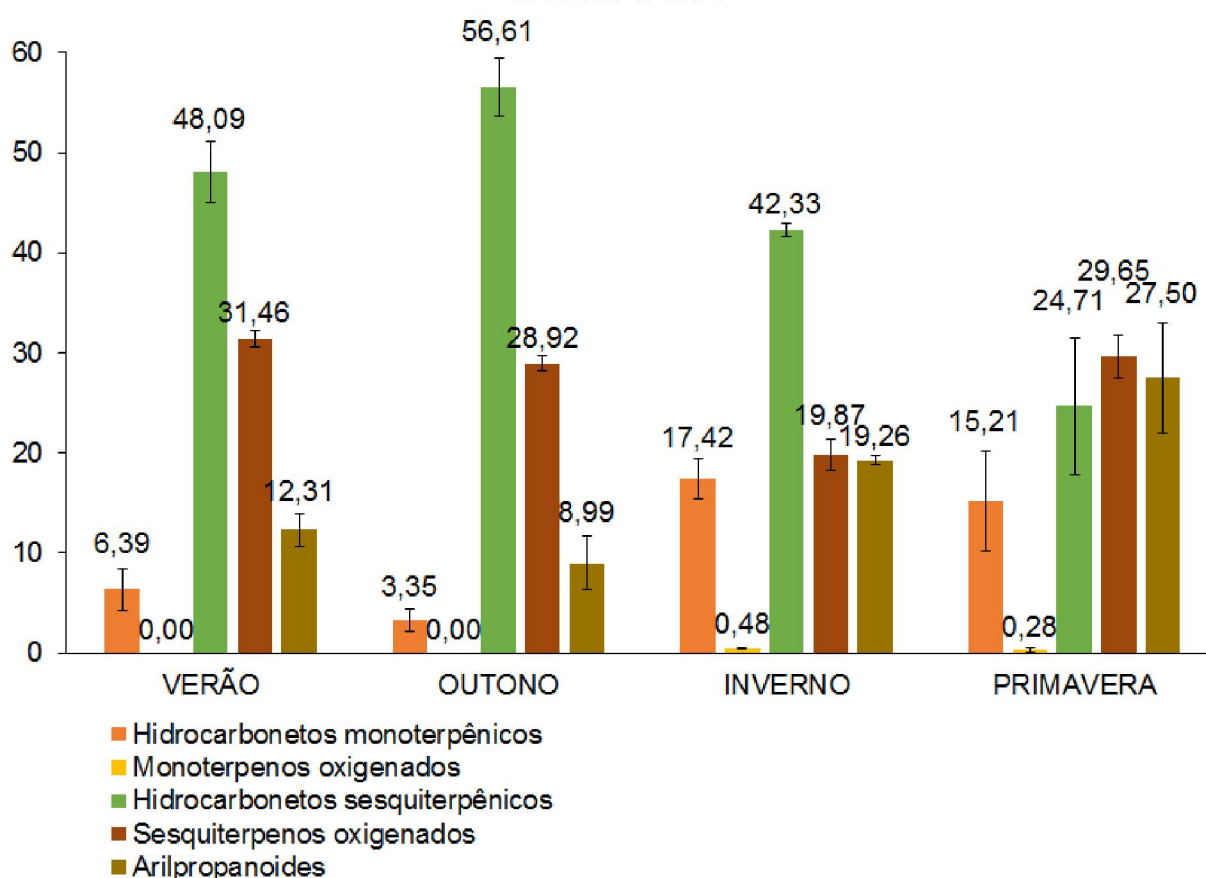
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO (conclusão)

| Constituintes | IA ^a | IA ^b | Amostras ^c | | | |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| α-cadinol (<i>epi</i> -α-cadinol) | 1644 | 1638 | 2,66±0,07 | | | |
| α-muurolol (δ-cadinol) | 1648 | 1646 | 0,45±0,39 | | | |
| β-eudesmol | 1651 | 1649 | 2,16±0,13 | 1,68±0,07 | 0,96±0,11 | 0,99±0,17 |
| α-cadinol | 1656 | 1652 | 4,42±0,26 | 3,97±0,07 | 2,07±0,17 | 1,27±0,21 |
| intermedeol | 1661 | 1665 | 1,90±0,11 | 0,30±0,51 | 0,90±0,12 | 0,86±0,13 |
| Hidrocarbonetos monoterpênicos | | | 6,39±0,10 | 3,35±1,12 | 17,42±1,99 | 15,21±5,00 |
| Monoterpenos oxigenados | | | | | 0,48±0,08 | 0,28±0,25 |
| Hidrocarbonetos sesquiterpênicos | | | 48,09±3,00 | 56,61±2,91 | 42,33±0,66 | 24,71±6,85 |
| Sesquiterpenos oxigenados | | | 31,46±0,81 | 28,92±0,77 | 19,87±1,57 | 29,65±2,12 |
| Arilpropanoides | | | 12,31±1,61 | 8,99±2,68 | 19,26±0,44 | 27,50±5,52 |
| Total | | | 98,25±0,10 | 97,87±0,27 | 99,37±0,07 | 97,35±1,81 |

FONTE: A autora (2018).

NOTA: ^aO índice aritmético apresentado é a média dos valores calculados para cada triplicata. ^bÍndice aritmético baseado na literatura (ADAMS, 2007). ^cOs resultados apresentados são as médias das triplicatas ± desvio padrão. ^dANDRADE, E. H. A. et al. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 1, p. 197-208, 2008. ^eÍndice de retenção baseado na literatura (NIST, 2018).

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS ÀS CLASSES DE CONSTITUINTES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE

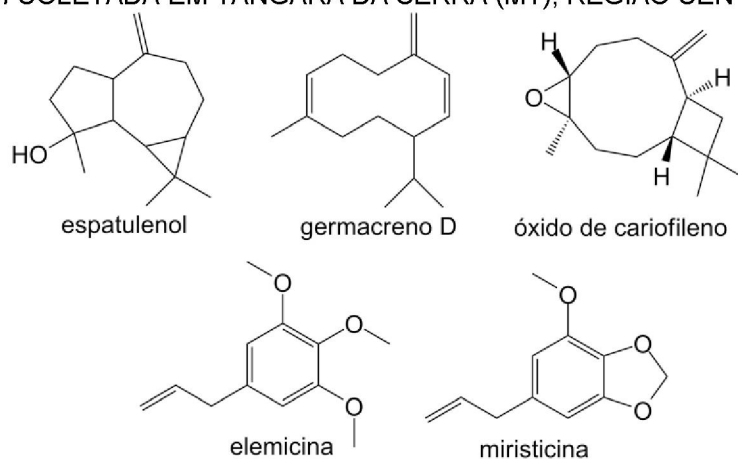


FONTE: A autora (2018).

No verão, os compostos majoritários são o biciclogermacreno (12,65%), o β -cariofileno (10,87%), o espatulenol (9,72%) e o α -copaeno (5,73%). No outono, tem-se como majoritários o espatulenol (11,32%), o biciclogermacreno (10,95%), o β -cariofileno (9,26%) e o germacreno D (7,32%). No inverno, os majoritários são o biciclogermacreno (11,52%), o β -cariofileno (9,78%), a miristicina (8,83%) e o espatulenol (8,25%). Já na primavera, tem-se o espatulenol (12,81%), a elemicina (11,07%), a miristicina (8,61%) e o óxido de cariofileno (8,26%) (FIGURA 10). Os compostos α -tujeno, sabineno, isoterpinoleno, terpinoleno, β -cubebeno, isolongifoleno, *allo*-aromadendreno, α -bulseneno e *epi*- α -cadinol foram encontrados apenas na Região Centro-Oeste.

No estudo de Andrade et al. (2008) também verificou-se a presença dos constituintes majoritários β -cariofileno (1,2 a 13,6%), biciclogermacreno (0,2 a 11,7%), α -copaeno (0,1 a 11,4%), germacreno D (0,5 a 10,4%), espatulenol (0,3 a 6,6%), elemicina (0,1 a 6,5%) e miristicina (0,2 a 16,0%). Jaramillo-Colorado et al. (2015) observaram a presença do germacreno D (36,6%) entre os majoritários. Nos estudos de Ribeiro, Camara e Ramos (2016) e Ramos et al. (1986) também foi observada a presença do β -cariofileno (16,0% e 4,01%, respectivamente) em suas amostras. Olivero-Verbel, Güette-Fernandez e Stashenko (2009) verificaram a presença de elemicina (18,0%), β -cariofileno (11,0%) e biciclogermacreno (4,1%) entre os majoritários. Silva et al. (2016) também relataram a presença do β -cariofileno e da miristicina entre os majoritários, com concentrações de 5,0 e 4,5%, respectivamente.

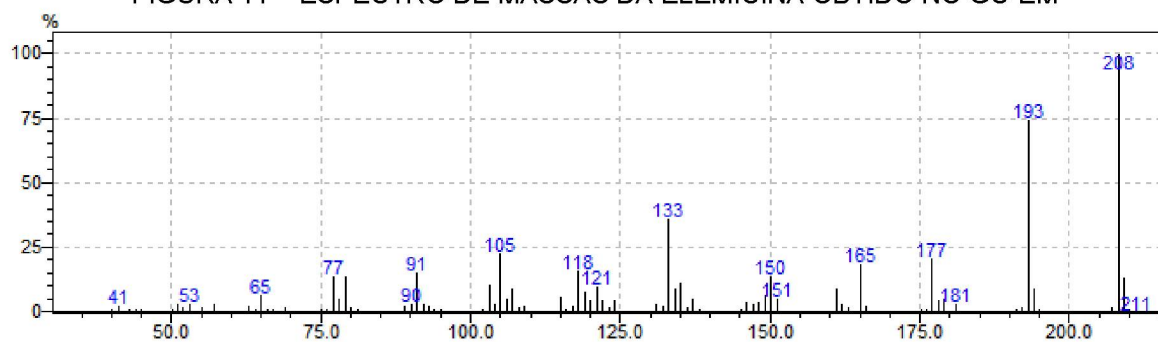
FIGURA 10 – ALGUNS DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE



FONTE: A autora (2018).

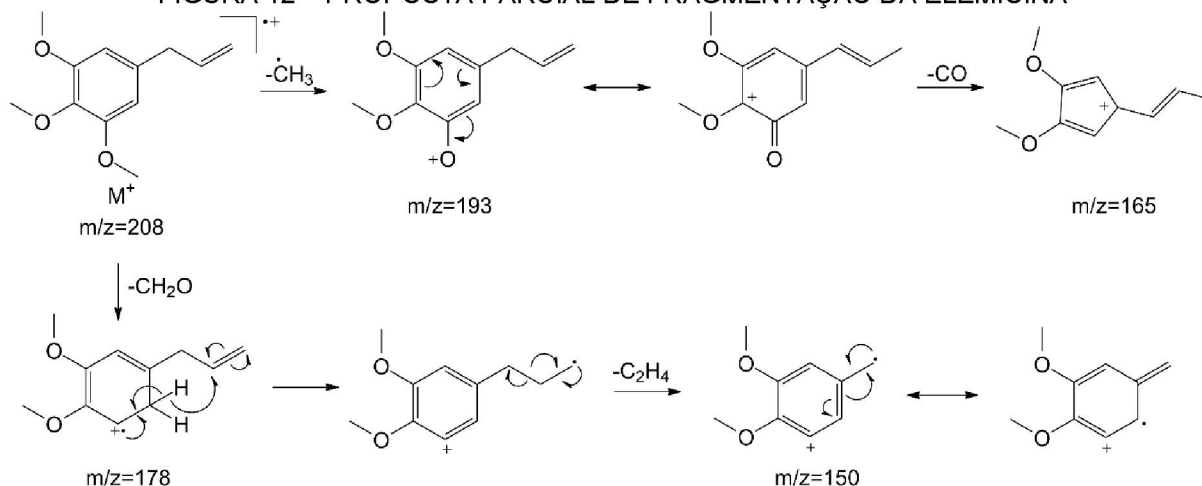
A FIGURA 11 mostra o espectro de massas da elemicina, um constituinte majoritário do óleo essencial de *P. marginatum* coletada na primavera na Região Centro-Oeste. Ademais, uma proposta de fragmentação pode ser visualizada na FIGURA 12.

FIGURA 11 – ESPECTRO DE MASSAS DA ELEMICINA OBTIDO NO GC-EM



FONTE: A autora (2018).

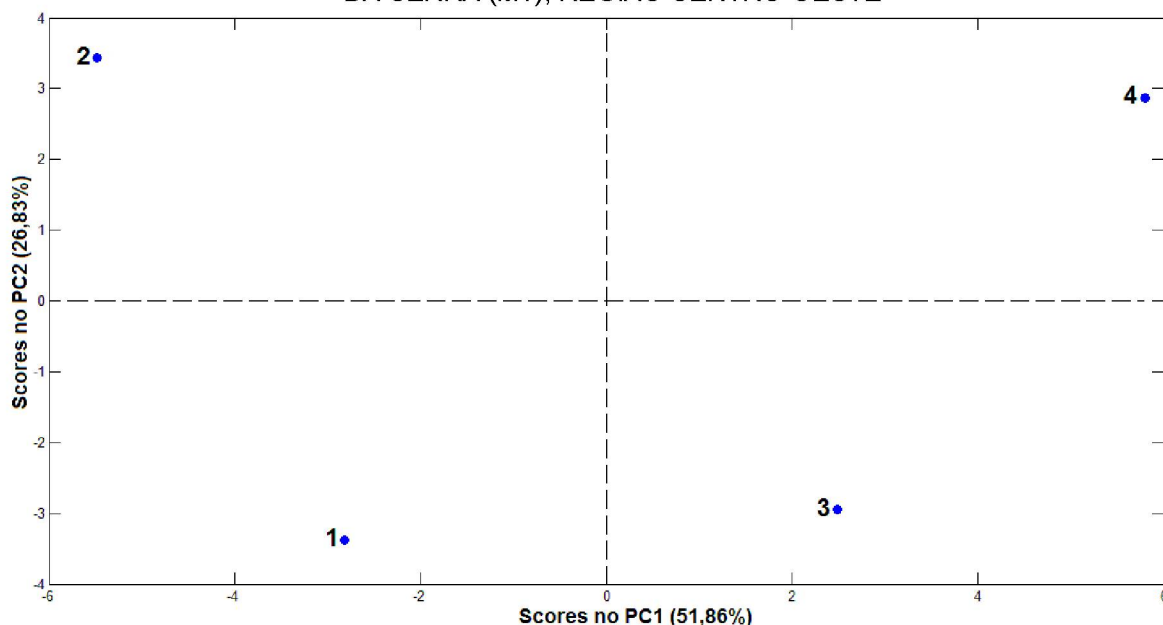
FIGURA 12 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DA ELEMICINA



FONTE: A autora (2018).

A ACP dos resultados obtidos gerou 3 componentes principais, sendo que o primeiro componente (PC1) explica 51,86% da variância estudada, enquanto que o segundo (PC2) explica 26,83%, totalizando 78,69% (GRÁFICOS 2 e 3). Observando o gráfico de *Scores*, as quatro estações estão nitidamente em quadrantes distintos, demonstrando que têm diferenças entre as amostras.

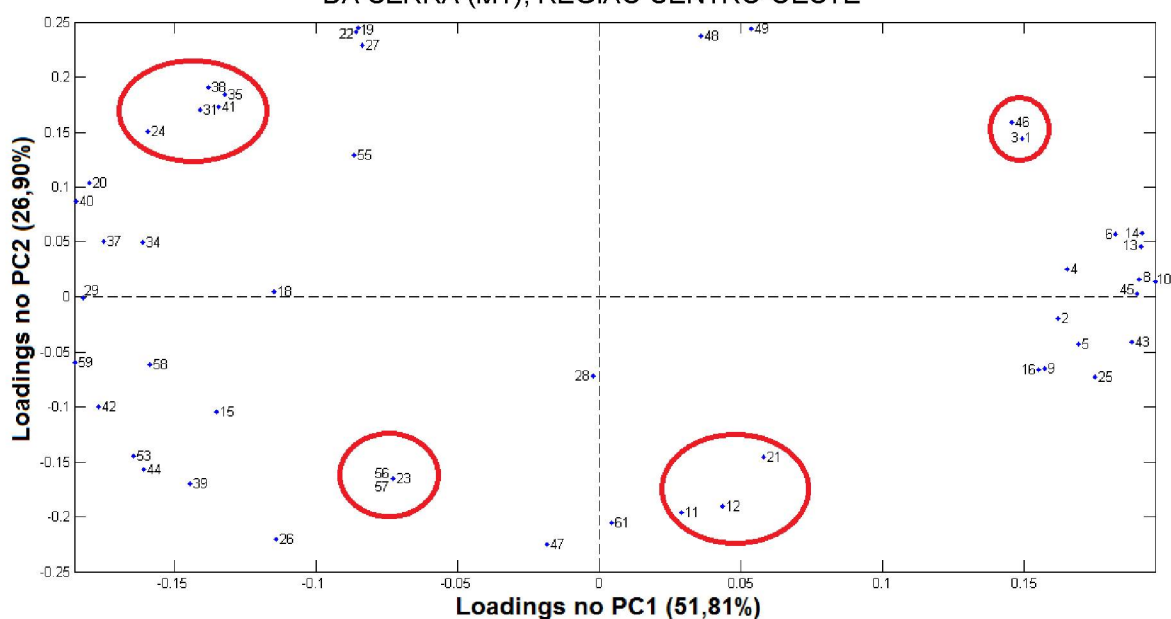
GRÁFICO 2 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: 1 – Verão. 2 – Outono. 3 – Inverno. 4 – Primavera.

GRÁFICO 3 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM TANGARÁ DA SERRA (MT), REGIÃO CENTRO-OESTE



FONTE: A autora (2018).

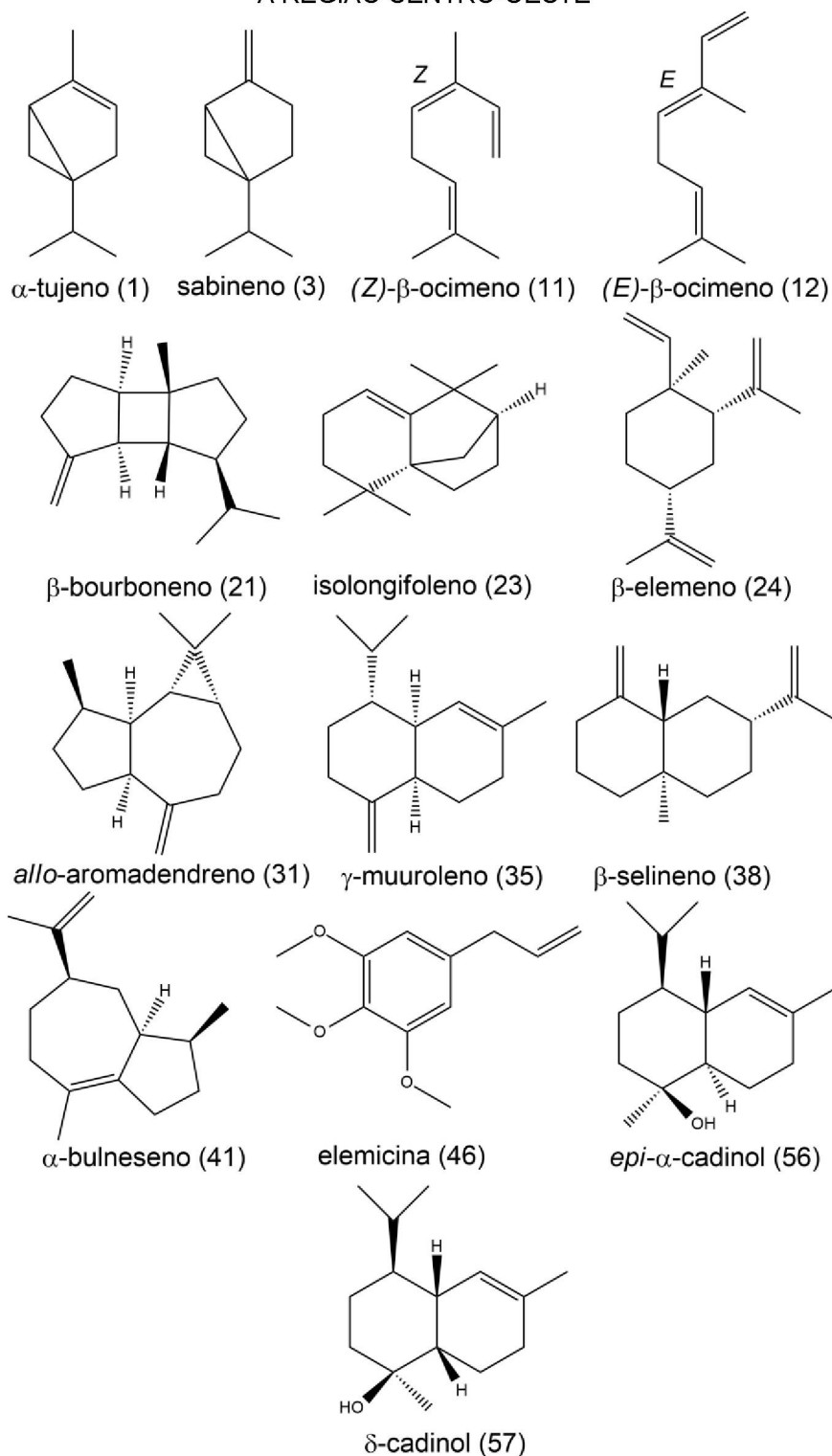
NOTA: As numerações dos constituintes seguem as do Apêndice 1 (p. 84 e 85).

A partir do gráfico de *Loadings*, é possível verificar que os principais constituintes responsáveis pela diferenciação da estação de verão são o isolongifoleno (23), um hidrocarboneto sesquiterpênico, bem como o *epi*- α -cadinol (56) e o δ -cadinol (α -muurolol) (57), dois sesquiterpenos oxigenados, constituintes

minoritários encontrados somente nesta estação para a Região Centro-Oeste (FIGURA 13).

Os constituintes responsáveis pela diferenciação da estação de outono foram os hidrocarbonetos sesquiterpênicos minoritários β -elemeno (**24**), *allo*-aromadendreno (**31**), γ -muuroleno (**35**), β -selineno (**38**) e α -bulneseno (δ -guaieno) (**41**). Na estação de inverno, os principais constituintes responsáveis pela sua diferenciação foram os hidrocarbonetos monoterpênicos (*Z*)- β -ocimeno (**11**), (*E*)- β -ocimeno (**12**) e o hidrocarboneto sesquiterpênico β -bourboneno (**21**). Os principais constituintes responsáveis pela diferenciação da estação de primavera foram o α -tujeno (**1**) e o sabineno (**3**), dois hidrocarbonetos monoterpênicos, bem como a elemicina (**46**), um arilpropanoide majoritário, encontrado em maior concentração nesta estação para a Região Centro-Oeste.

FIGURA 13 – CONSTITUINTES RESPONSÁVEIS PELA DIFERENCIAÇÃO DAS ESTAÇÕES PARA A REGIÃO CENTRO-OESTE



FONTE: A autora (2018).

Nas amostras da Região Norte foram identificadas 45 substâncias. Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos são a classe predominante das estações do verão, outono e inverno, compondo cerca de 50% dos óleos essenciais, enquanto os

arilpropanoides são majoritários na primavera, correspondendo a 52% da composição química total (TABELA 3, GRÁFICO 4).

No verão, além dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, os arilpropanoides também apresentam alta concentração com 32%, seguidos dos sesquiterpenos oxigenados (16%), hidrocarbonetos monoterpênicos (6%) e monoterpênos oxigenados (0,4%). No outono tem-se uma inversão: 35% do óleo volátil corresponde aos sesquiterpenos oxigenados e 17% aos arilpropanoides, além dos hidrocarbonetos monoterpênicos (2%). No inverno, os sesquiterpenos oxigenados e arilpropanoides aparecem em mesma concentração (cerca de 20%), enquanto os hidrocarbonetos monoterpênicos apresentam concentração de 7% e os monoterpênos oxigenados, 0,6%. Na primavera, além dos arilpropanoides, tem-se hidrocarbonetos sesquiterpênicos (22%), hidrocarbonetos monoterpênicos (13%), sesquiterpenos oxigenados (11%) e monoterpênos oxigenados (0,6%). É possível observar que nas estações do verão, outono e inverno, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos mantiveram-se constantes, variando o teor de arilpropanoides.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

(continua)

| Constituintes | IA ^a | IA ^b | Amostras ^c | | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|------------|-----------|
| | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| α-pineno | 933 | 932 | 0,96±0,57 | 0,60±0,22 | 1,14±0,53 | 1,79±0,38 |
| β-pineno | 976 | 974 | 0,64±0,27 | 0,44±0,15 | 0,89±0,29 | 1,41±0,41 |
| mirreno | 992 | 988 | | | 0,14±0,04 | 0,35±0,17 |
| δ-3-careno | 1011 | 1008 | 0,37±0,21 | 0,31±0,12 | 0,42±0,11 | 1,07±0,26 |
| α-terpineno | 1017 | 1014 | | | | 0,10±0,17 |
| p-cimeno | 1025 | 1020 | 0,36±0,13 | | 0,30±0,12 | 0,10±0,17 |
| silvestreno | 1029 | 1025 | | | 0,20±0,11 | 0,39±0,07 |
| (Z)-β-ocimeno | 1038 | 1032 | 1,35±0,47 | 0,62±0,13 | 1,80±0,29 | 2,89±0,98 |
| (E)-β-ocimeno | 1048 | 1044 | 2,04±0,57 | 0,50±0,11 | 2,25±0,27 | 5,11±1,81 |
| γ-terpineno | 1059 | 1054 | 0,22±0,04 | | 0,21±0,14 | 0,26±0,10 |
| linalol | 1101 | 1095 | 0,36±0,13 | | 0,57±0,04 | 0,55±0,26 |
| safrol | 1290 | 1285 | 0,12±0,20 | | | 1,61±0,40 |
| δ-elemeno | 1338 | 1335 | 0,62±0,42 | 0,57±0,15 | 0,70±0,17 | 0,73±0,10 |
| ciclosativeno | 1365 | 1369 | | 0,37±0,05 | 0,41±0,02 | |
| α-copaeno | 1376 | 1374 | 2,17±0,74 | 3,23±0,44 | 2,39±0,16 | 0,72±0,14 |
| β-bourboneno | 1385 | 1387 | 2,34±0,57 | 2,56±0,48 | 5,37±0,54 | 0,66±0,04 |
| β-elemeno | 1392 | 1389 | | 0,26±0,24 | 0,48±0,04 | |
| metil eugenol | 1407 | 1403 | 0,77±0,38 | 1,44±0,23 | 1,73±0,12 | 2,06±0,27 |
| β-cariofileno | 1419 | 1417 | 7,14±1,42 | 10,72±1,57 | 11,81±0,49 | 5,06±0,49 |
| β-copaeno | 1429 | 1430 | 0,74±0,33 | 0,94±0,15 | 1,35±0,08 | 0,11±0,10 |
| aromadendreno | 1445 | 1439 | | 0,56±0,14 | 0,98±0,04 | |
| α-humuleno | 1453 | 1452 | 0,80±0,18 | 1,41±0,17 | 1,26±0,05 | 0,58±0,05 |
| cis-cadina-1(6),4-dieno | 1463 | 1461 | | 0,26±0,23 | 0,67±0,01 | |
| α-neocalitropseno | 1473 | 1474 | | 0,13±0,22 | | |
| γ-muroleno | 1477 | 1478 | 0,47±0,15 | 0,71±0,05 | 0,54±0,06 | |
| germacreno D | 1481 | 1484 | 11,29±2,57 | 8,47±1,85 | 10,45±0,53 | 7,64±0,79 |

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

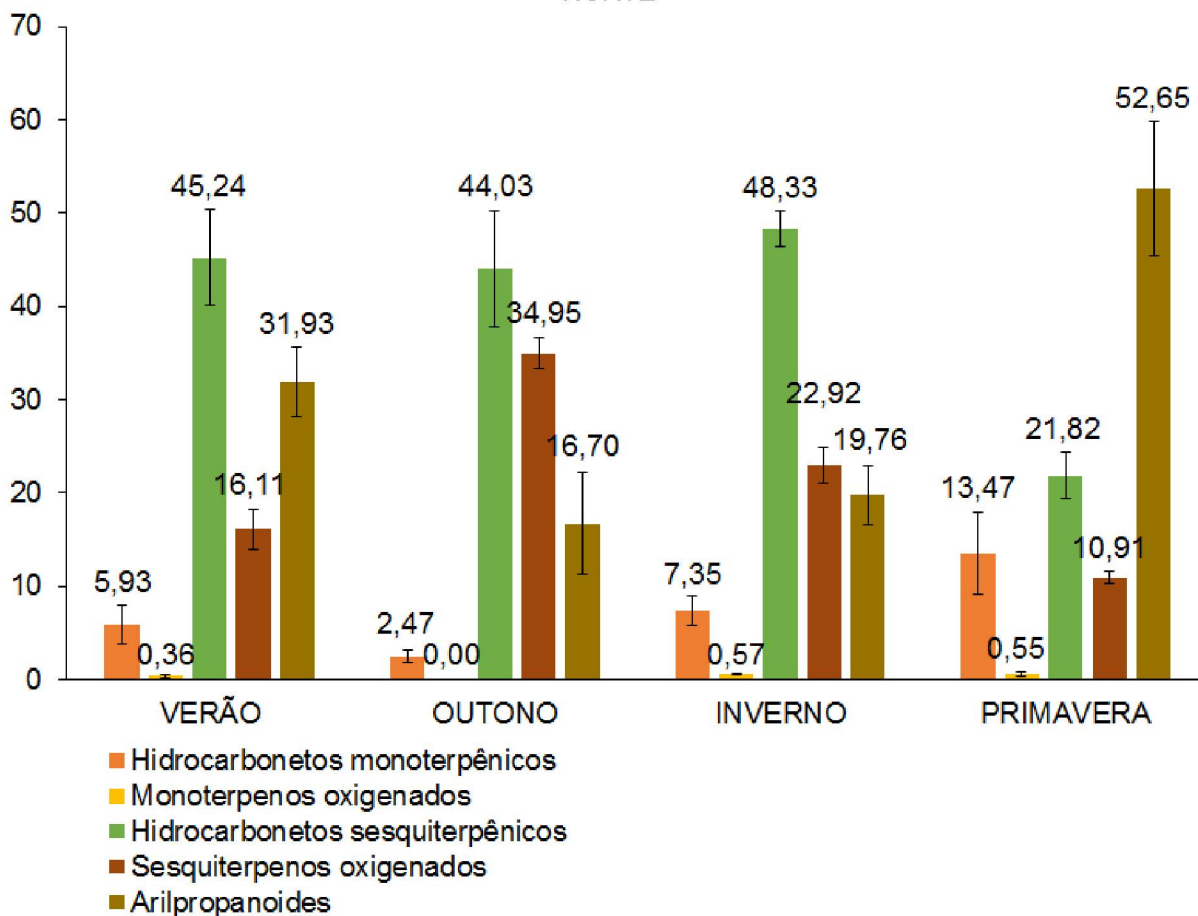
(conclusão)

| Constituintes | IA ^a | IA ^b | Amostras ^c | | | |
|----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| β-selineno (β-eudesmeno) | 1486 | 1489 | 0,41±0,05 | 1,27±0,26 | 0,86±0,07 | 0,47±0,17 |
| biciclogermacreno | 1497 | 1500 | 8,85±1,53 | 7,55±0,75 | 7,65±0,26 | 4,71±0,89 |
| α-muroleno | 1501 | 1500 | 0,71±0,36 | 1,58±0,29 | 1,35±0,07 | |
| γ-cadineno | 1512 | 1513 | 7,21±2,77 | 0,81±0,71 | | |
| miristicina | 1515 | 1517 | 3,64±2,49 | 2,79±0,66 | 8,59±2,31 | 18,35±3,37 |
| δ-cadineno | 1525 | 1522 | 2,49±0,37 | 2,62±0,22 | 2,06±0,65 | 1,16±0,02 |
| 3,4-metilenodioxipropiofenona | 1534 | 1545 ^d | 21,72±1,63 | 7,45±3,49 | 4,45±0,75 | 26,62±7,63 |
| elemicina | 1560 | 1555 | 5,67±0,90 | 4,57±1,01 | 4,99±0,33 | 4,01±0,19 |
| (E)-nerolidol | 1565 | 1561 | 1,25±0,24 | 2,08±0,09 | 1,25±0,07 | 1,12±0,01 |
| espatulenol | 1578 | 1577 | 6,79±0,58 | 12,89±0,93 | 9,26±0,77 | 3,47±0,54 |
| óxido de cariofileno | 1584 | 1582 | 2,51±1,15 | 6,73±0,50 | 5,62±1,05 | 1,50±0,02 |
| guaiol | 1605 | 1600 | | 1,30±0,04 | 0,88±0,34 | |
| epóxido de humuleno II | 1610 | 1608 | | 1,26±0,07 | | |
| dilapiol | 1627 | 1620 | | 0,46±0,40 | | |
| isoespatulenol | 1630 | 1628 ^e | 1,97±0,63 | 2,29±0,04 | 1,24±0,11 | 1,16±0,45 |
| α-murolol (δ-cadinol) | 1648 | 1646 | | 0,73±0,09 | | |
| β-eudesmol | 1651 | 1649 | 0,92±0,18 | 2,26±0,12 | 1,31±0,04 | 1,06±0,04 |
| α-cadinol | 1656 | 1652 | 1,63±0,10 | 3,04±0,11 | 1,88±0,05 | 1,37±0,05 |
| intermedeol | 1661 | 1665 | 1,03±0,07 | 2,37±0,12 | 1,49±0,06 | 1,21±0,07 |
| Hidrocarbonetos monoterpênicos | | | 5,93±2,04 | 2,47±0,66 | 7,35±1,60 | 13,47±4,38 |
| Monoterpenos oxigenados | | | 0,36±0,13 | | 0,57±0,04 | 0,55±0,26 |
| Hidrocarbonetos sesquiterpênicos | | | 45,24±5,12 | 44,03±6,22 | 48,33±1,92 | 21,82±2,49 |
| Sesquiterpenos oxigenados | | | 16,11±2,09 | 34,95±1,65 | 22,92±1,92 | 10,91±0,66 |
| Arilpropanoides | | | 31,93±3,71 | 16,70±5,46 | 19,76±3,16 | 52,65±7,21 |
| Total | | | 99,57±0,75 | 98,14±0,35 | 98,94±0,16 | 99,41±0,06 |

FONTE: A autora (2018).

NOTA: ^aO índice aritmético apresentado é a média dos valores calculados para cada triplicata. ^bÍndice aritmético baseado na literatura (ADAMS, 2007). ^cOs resultados apresentados são as médias das triplicatas ± desvio padrão. ^dANDRADE, E. H. A. et al. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 1, p. 197-208, 2008. ^eÍndice de retenção baseado na literatura (NIST, 2018).

GRÁFICO 4 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS ÀS CLASSES DE CONSTITUINTES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE



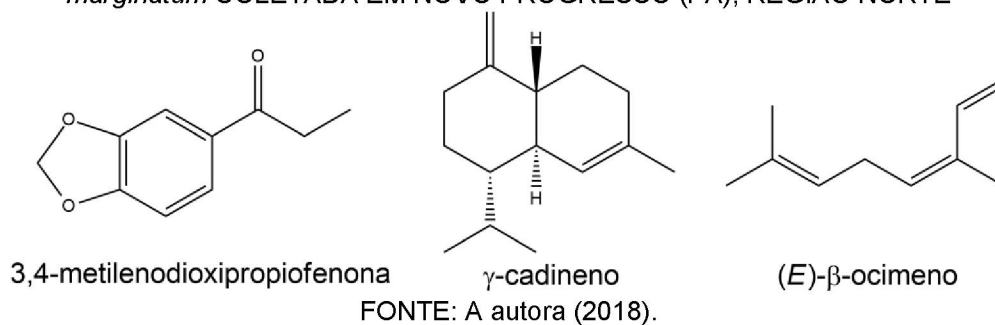
FONTE: A autora (2018).

Os constituintes majoritários do verão são o 3,4-metilenodioxipropiofenona (21,72%), o germacreno D (11,29%), o biciclogermacreno (8,85%) e o γ -cadineno (7,21%). No outono, tem-se como majoritários o espatulenol (12,89%), o β -cariofileno (10,72%), o germacreno D (8,47%) e o biciclogermacreno (7,55%). No inverno, aparecem como majoritários o β -cariofileno (11,81%), o germacreno D (10,45%), o espatulenol (9,26%) e a miristicina (8,59%). Já na primavera, tem-se como majoritários o 3,4-metilenodioxipropiofenona (26,62%), a miristicina (18,35%), o germacreno D (7,64%) e o (*E*)- β -ocimeno (5,11%) (FIGURA 14). Os compostos que aparecem somente na Região Norte são o δ -3-careno, o safrol, o *cis*-cadin-1(6),4-dieno, o guaíol e o epóxido de humuleno II.

Silva et al. (2016) também verificaram, em seu estudo, a presença do 3,4-metilenodioxipropiofenona (21,8%) no óleo essencial de *P. marginatum*. Andrade et al. (2008) também observaram a presença deste composto (7,3 a 40,7%) e do (*E*)- β -

ocimeno (0,4 a 15,2%). Souto et al. (2012) estudaram os óleos essenciais das partes aéreas secas de *P. marginatum* coletada em Belém (PA) e tiveram os mesmos resultados que os de Andrade et al. (2008), com concentrações de 19,0% e 9,8% respectivamente.

FIGURA 14 – ALGUNS DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE



A FIGURA 15 mostra o espectro de massas do 3,4-metilenodioxipropiophenona, um constituinte majoritário do óleo essencial de *P. marginatum* coletada no verão e primavera na Região Norte. Além disso, uma proposta de fragmentação pode ser visualizada na FIGURA 16.

FIGURA 15 – ESPECTRO DE MASSAS DO 3,4-METILENODIOXIPROPIOFENONA OBTIDO NO CG-EM

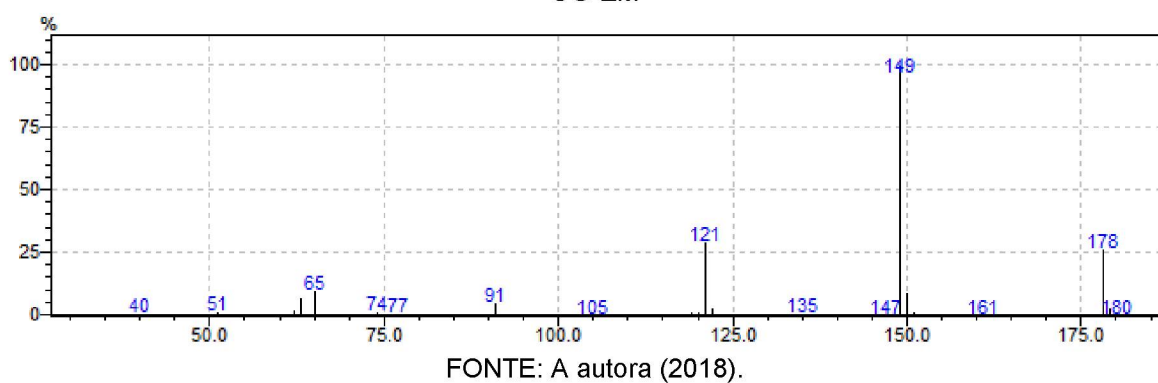
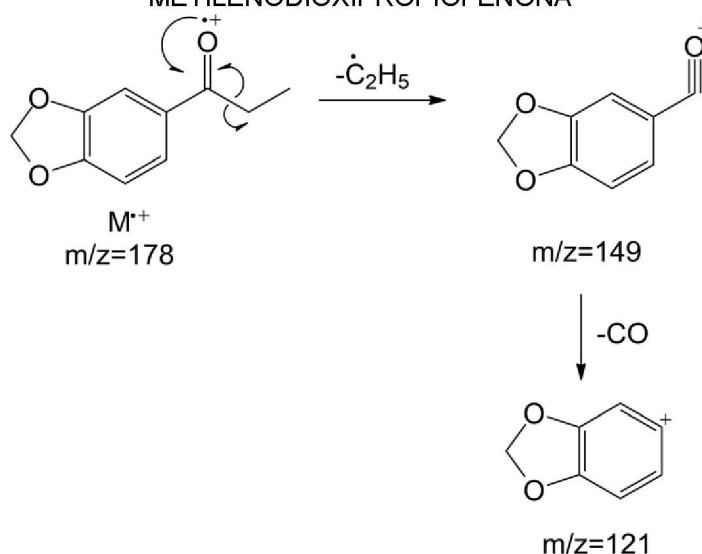


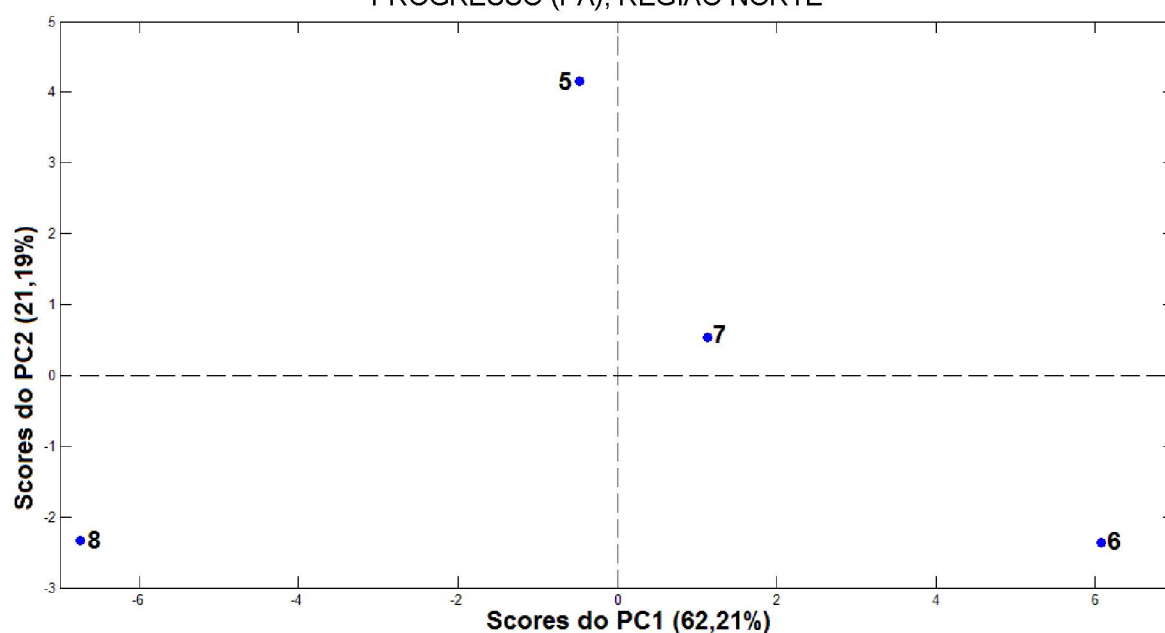
FIGURA 16 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DO 3,4-METILENODIOXIPROPIOFENONA



FONTE: A autora (2018).

A ACP das análises dos óleos essenciais da Região Norte gerou 3 componentes principais, sendo que o PC1 explica 62,21% da variância estudada, enquanto o PC2 explica 21,19%, totalizando 83,4% (GRÁFICOS 5 e 6). Observando o gráfico de Scores, é possível notar que cada estação está num quadrante diferente, mas há uma proximidade das estações verão (5) e inverno (7), enquanto as estações outono (6) e primavera (8) são mais distintas.

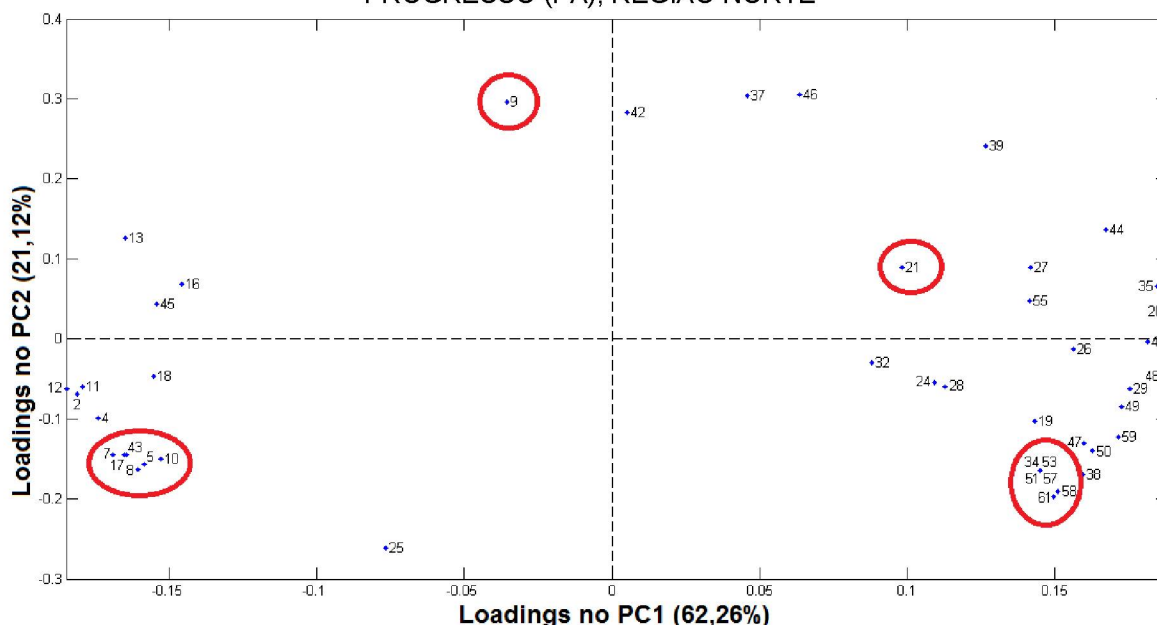
GRÁFICO 5 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: 5 – Verão. 6 – Outono. 7 – Inverno. 8 – Primavera

GRÁFICO 6 – *LOADINGS* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM NOVO PROGRESSO (PA), REGIÃO NORTE



FONTE: A autora (2018).

NOTA: As numerações dos constituintes seguem as do Apêndice 1 (p. 84 e 85).

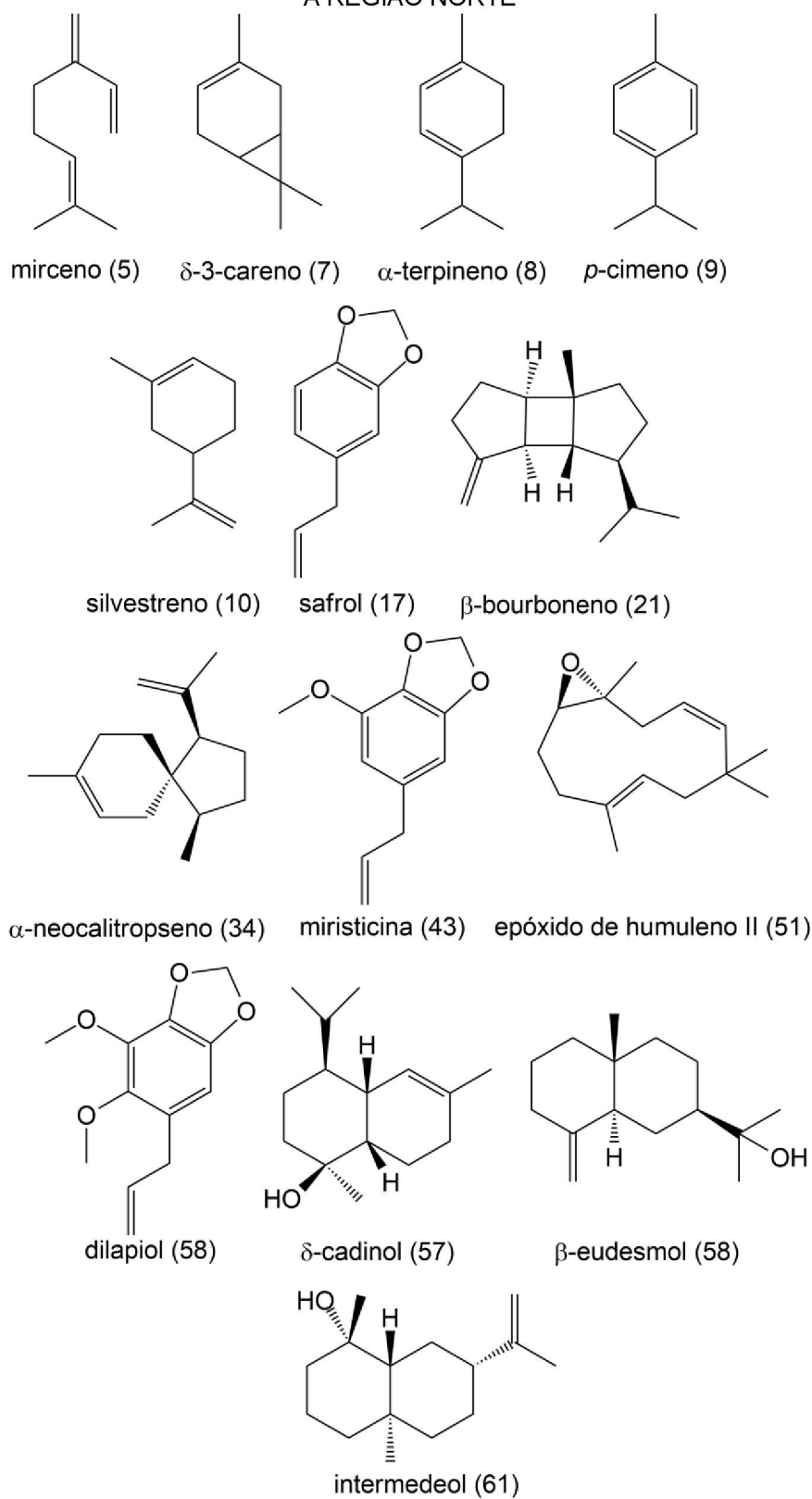
Pelo gráfico de *Loadings*, o principal constituinte responsável pela diferenciação do verão foi o *p*-cimeno (**9**), um hidrocarboneto monoterpênico minoritário encontrado em maior concentração nesta estação para a Região Norte (FIGURA 17).

Os principais constituintes responsáveis pela diferenciação do outono foram o α -neocalitropseno (**34**), um hidrocarboneto sesquiterpênico, o epóxido de humuleno II (**51**) e o δ -cadinol (α -muurolol) (**57**), que são sesquiterpenos oxigenados, o dilapiol (**53**), um arilpropanoide, bem como o β -eudesmol (**58**) e o intermedeol (**61**), sesquiterpenos oxigenados minoritários encontrados em maior concentração nesta estação para a Região Norte.

O principal constituinte responsável pela diferenciação do inverno foi o β -bourboneno (**21**), um hidrocarboneto sesquiterpênico minoritário encontrado em maior concentração nesta estação para a Região Norte.

Os constituintes responsáveis pela diferenciação da primavera foram os hidrocarbonetos monoterpênicos minoritários mirceno (**5**), δ -3-careno (**7**), silvestreno (**10**) e a miristicina (**43**), um arilpropanoide majoritário, encontrados em maior concentração nesta estação para a Região Norte, bem como o α -terpineno (**8**), um hidrocarboneto monoterpênico, e o safrol (**17**), um arilpropanoide, constituintes minoritários encontrados apenas nesta estação para a Região Norte.

FIGURA 17 – CONSTITUINTES RESPONSÁVEIS PELA DIFERENCIAÇÃO DAS ESTAÇÕES PARA A REGIÃO NORTE



FONTE: A autora (2018).

Nas amostras da Região Nordeste foram identificadas 25 substâncias. Observa-se que em todas as estações os arilpropanoides são predominantes, seguidos dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, dos hidrocarbonetos monoterpênicos e dos sesquiterpenos oxigenados, exceto na primavera, na qual os arilpropanoides e hidrocarbonetos sesquiterpênicos aparecem em mesma concentração (em média 40%). A estação com o maior teor de arilpropanoides é a do verão (76%), seguido do outono (62%), inverno (55%) e primavera (40%). Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos apresentam teores aproximadamente constantes no verão, outono e inverno (aproximadamente 25%), aumentando na primavera (em torno de 40%) (TABELA 4, GRÁFICO 7).

A diminuição no teor dos arilpropanoides coincide em um aumento dos hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos da estação do verão para a estação da primavera. Nota-se que a concentração da exalatacina e da piper margina vai diminuindo progressivamente do verão à primavera, sendo de 26% e 19%, respectivamente, no verão, chegando a 13% e 2%, respectivamente, na primavera. A concentração do 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno mantém-se constante ao longo das estações (cerca de 25%) e a do biciclogermacreno e do β -cariofileno aumentam do verão à primavera, passando de 6% na primeira para 12% e 17%, respectivamente, na última.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

(continua)

| Constituintes | IA ^a | IA ^b | Amostras ^c | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| α -pineno | 933 | 932 | 0,34 \pm 0,20 | 3,12 \pm 0,79 | 6,56 \pm 1,38 | 5,64 \pm 2,27 |
| β -pineno | 976 | 974 | 0,22 \pm 0,16 | 2,03 \pm 0,60 | 4,77 \pm 1,10 | 3,89 \pm 1,53 |
| α -felandreno | 1005 | 1002 | 0,15 \pm 0,25 | 2,35 \pm 0,55 | 2,36 \pm 0,64 | 2,61 \pm 1,37 |
| δ -3-careno | 1010 | 1008 | | | | 1,00 \pm 0,70 |
| silvestreno | 1029 | 1025 | | 0,47 \pm 0,36 | 0,90 \pm 0,29 | 0,82 \pm 0,53 |
| δ -elemeno | 1337 | 1335 | 0,72 \pm 0,18 | 0,72 \pm 0,51 | 2,98 \pm 0,23 | 2,19 \pm 0,63 |
| α -copaeno | 1376 | 1374 | 1,25 \pm 0,33 | 1,84 \pm 0,72 | 0,77 \pm 0,08 | 1,96 \pm 0,45 |
| β -elemeno | 1392 | 1389 | 0,62 \pm 0,22 | 0,85 \pm 0,38 | 0,46 \pm 0,06 | 0,66 \pm 0,17 |
| β -cariofileno | 1420 | 1417 | 6,28 \pm 2,14 | 7,79 \pm 1,14 | 6,37 \pm 1,01 | 12,40 \pm 2,47 |
| β -copaeno | 1430 | 1430 | 0,20 \pm 0,35 | | 0,48 \pm 0,10 | 0,68 \pm 0,32 |
| α -humuleno (α -cariofileno) | 1454 | 1452 | 0,36 \pm 0,03 | 0,44 \pm 0,15 | 0,46 \pm 0,07 | 0,86 \pm 0,30 |
| croweacina | 1461 | 1457 | 1,22 \pm 2,11 | 2,74 \pm 2,71 | 0,69 \pm 0,18 | |
| ishwarano | 1467 | 1465 | 5,35 \pm 2,54 | 6,27 \pm 4,71 | | 2,89 \pm 1,32 |
| γ -muuroleno | 1474 | 1478 | | | 0,20 \pm 0,35 | |
| γ -curcumeno | 1477 | 1481 | 0,64 \pm 0,36 | 1,00 \pm 0,59 | 1,96 \pm 0,12 | 3,30 \pm 0,51 |
| biciclogermacreno | 1497 | 1500 | 6,64 \pm 2,20 | 9,98 \pm 1,79 | 12,23 \pm 1,05 | 16,55 \pm 2,19 |
| α -muuroleno | 1501 | 1500 | | | 1,09 \pm 0,24 | 1,51 \pm 0,33 |
| δ -cadineno | 1525 | 1522 | 0,26 \pm 0,01 | 0,11 \pm 0,20 | 0,35 \pm 0,17 | 0,29 \pm 0,07 |
| espatulenol | 1579 | 1577 | | | 1,56 \pm 0,34 | 1,97 \pm 0,17 |

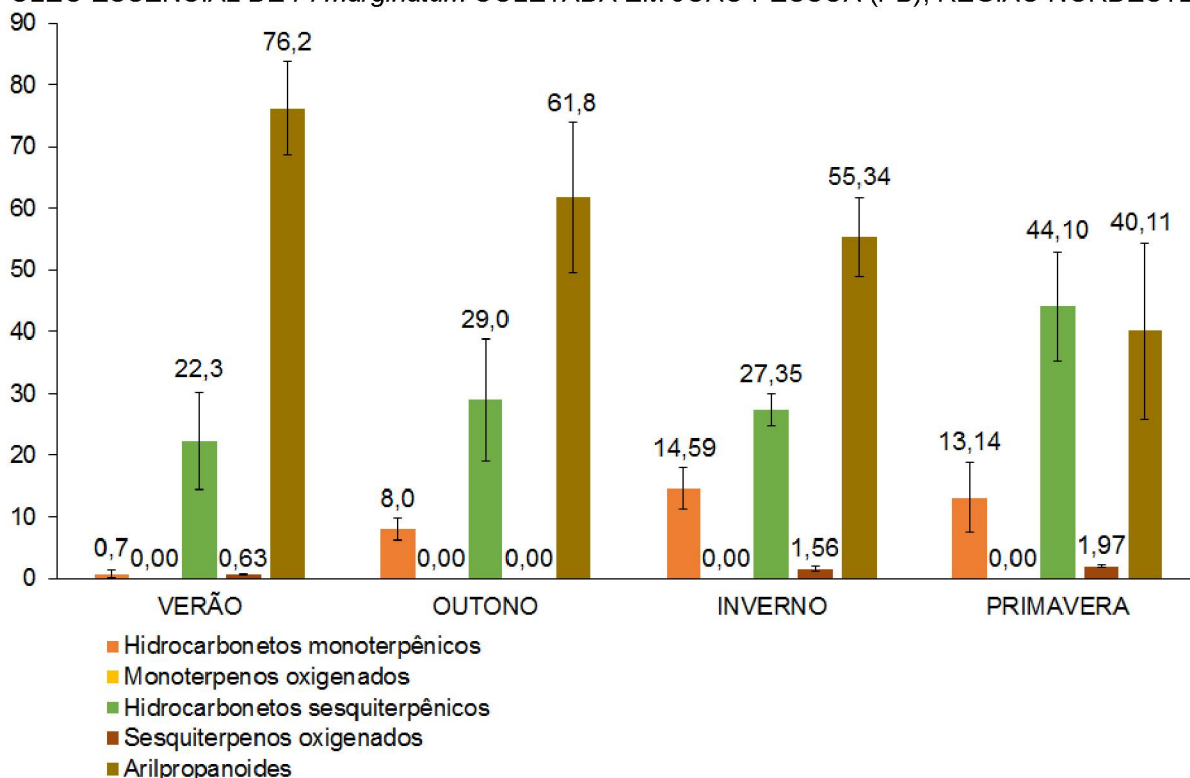
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE, NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO

(conclusão)

| Constituintes | IA ^a | IA ^b | Amostras ^c | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| β-asarona | 1626 | 1616 | 1,63±0,22 | 1,01±0,90 | 0,54±0,52 | 0,32±0,55 |
| 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno ^d | 1629 | - | 24,92±1,15 | 25,46±4,71 | 23,89±4,84 | 24,32±6,56 |
| β-eudesmol (β-selinenol) | 1653 | 1649 | 0,63±0,09 | | | |
| exalatacina | 1660 | 1655 | 26,47±3,29 | 17,73±1,98 | 16,68±1,40 | 12,67±4,92 |
| α-asarona | 1687 | 1675 | 2,69±0,20 | 1,57±0,67 | 0,67±0,62 | 0,17±0,30 |
| 2,4,6-trimetoxi-1-[(1E)-1-propenil]benzeno (piper margina) ^d | 1720 | - | 19,31±3,21 | 13,29±3,78 | 12,86±1,46 | 2,63±2,06 |
| Hidrocarbonetos monoterpênicos | | | 0,71±0,61 | 7,98±1,77 | 14,59±3,34 | 13,14±5,69 |
| Hidrocarbonetos sesquiterpênicos | | | 22,31±7,95 | 29,00±9,90 | 26,35±2,57 | 44,10±8,80 |
| Sesquiterpenos oxigenados | | | 0,63±0,09 | | 1,56±0,34 | 1,97±0,17 |
| Arilpropanoides | | | 76,25±7,54 | 61,79±12,21 | 55,34±6,34 | 40,11±14,30 |
| Total | | | 99,90±0,17 | 98,77±0,76 | 98,84±0,87 | 99,32±0,22 |

FONTE: A autora (2018).

NOTA: ^aO índice aritmético apresentado é a média dos valores calculados para cada triplicata. ^bÍndice aritmético baseado na literatura (ADAMS, 2007). ^cOs resultados apresentados são as médias das triplicatas ± desvio padrão. ^dConstituintes identificados por CG-EM e RMN.

GRÁFICO 7 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS ÀS CLASSES DE COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE

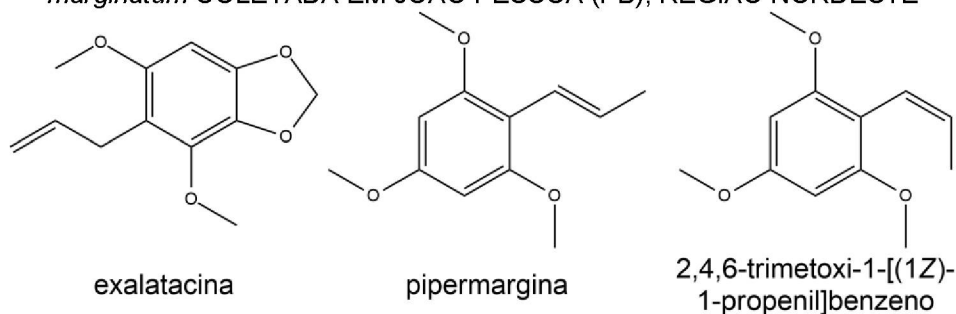
FONTE: A autora (2018).

Os compostos majoritários das quatro estações são os arilpropanoides exalatacina, 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno e a piper margina (FIGURA 18) e os hidrocarbonetos sesquiterpênicos biciclogermacreno e β-cariofileno. Os

compostos que aparecem somente na Região Nordeste são a croweacina, o ishwarano, o γ -curcumeno, a β -asarona, o 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno, a exalatacina, a α -asarona e a piper margina. É o primeiro relato da presença dos compostos piper margina e 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno em óleos essenciais.

Andrade et al. (2008) e Olivero-Verbel, Güette-Fernandez e Stashenko (2009) também verificaram, em seus estudos, a presença da exalatacina entre os majoritários, com concentração de 7,9% e 3,2%, respectivamente.

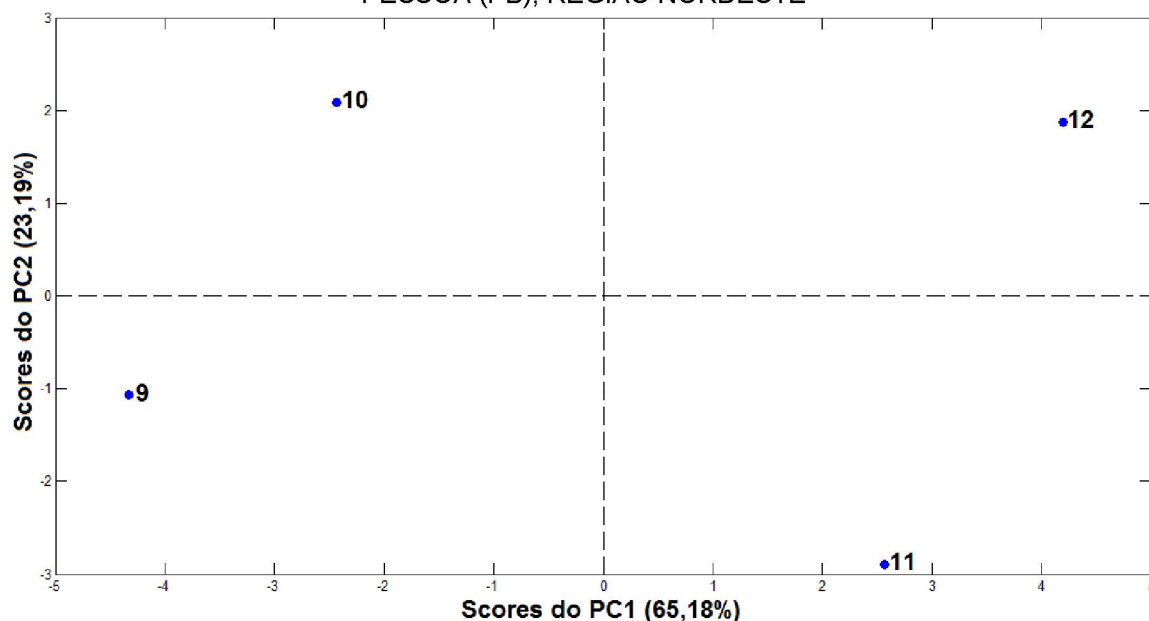
FIGURA 18 – ALGUNS DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE



FONTE: A autora (2018).

A ACP gerou três componentes principais, sendo que o PC1 explica 65,18% da variância estudada, enquanto o PC2 explica 23,19%, totalizando 88,37% (GRÁFICOS 8 e 9). O gráfico de *Scores* mostra as quatro estações separadas em cada quadrante, demonstrando que há diferenças entre elas.

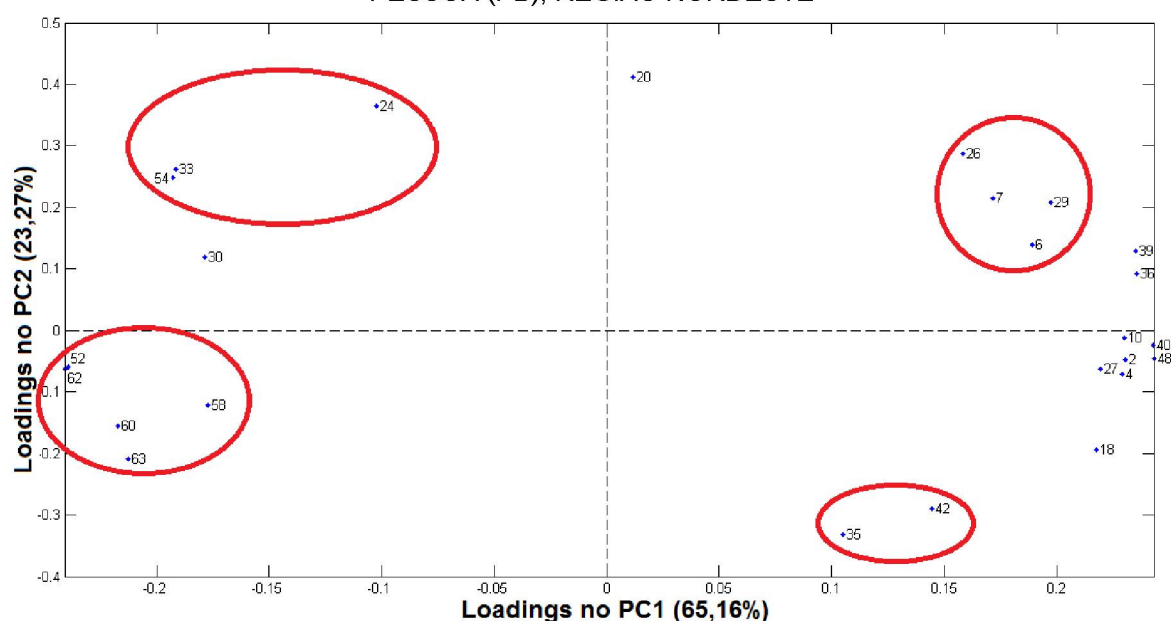
GRÁFICO 8 – SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: 9 – Verão. 10 – Outono. 11 – Inverno. 12 – Primavera.

GRÁFICO 9 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum* COLETADA EM JOÃO PESSOA (PB), REGIÃO NORDESTE



FONTE: A autora (2018).

NOTA: As numerações dos constituintes seguem as do Apêndice 1 (p. 84 e 85).

A partir do gráfico de *Loadings*, é possível determinar os principais constituintes responsáveis pela diferenciação do verão das demais estações. Estes foram a α -asarona (62) e a β -asarona (52), arilpropanoides minoritários, a piper margina (63) e a exaltacina (60), arilpropanoides majoritários encontrados em

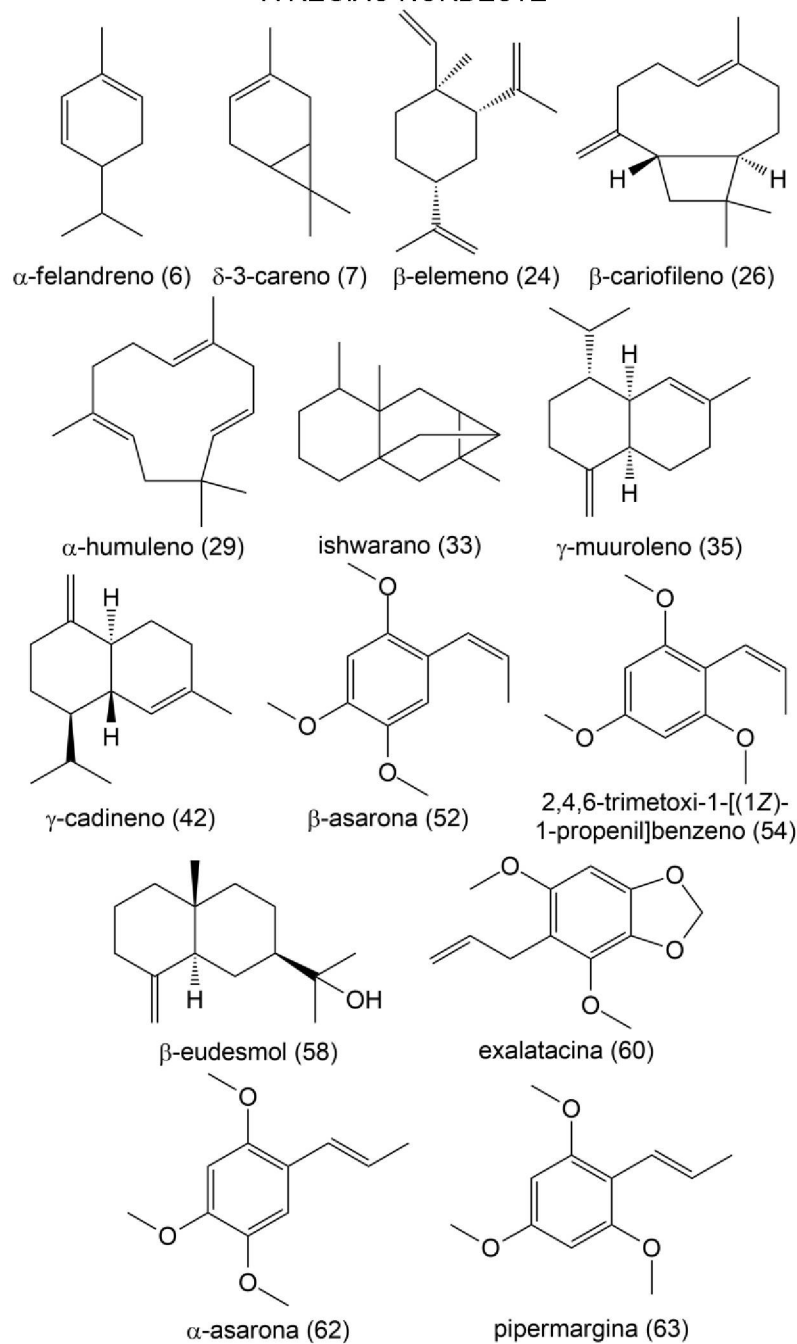
maior concentração nesta estação para a Região Nordeste, bem como o β -eudesmol (**58**), um sesquiterpeno oxigenado minoritário, encontrado somente nesta estação para a Região Nordeste (FIGURA 19).

Já no outono, os principais constituintes responsáveis pela diferenciação da estação foram o β -elemeno (**24**) e o ishwarano (**33**), hidrocarbonetos sesquiterpênicos minoritários, bem como o 2,4,6-trimetoxi-[(1Z)-1-propenil]benzeno (**54**), um arilpropanoide majoritário encontrado em maior concentração nesta estação para a Região Nordeste.

No caso do inverno, os principais constituintes responsáveis pela diferenciação da estação foram o γ -cadineno (**42**), um hidrocarboneto sesquiterpênico minoritário encontrado em maior concentração nesta estação para a Região Nordeste, bem como o γ -muuroleno (**35**), um hidrocarboneto sesquiterpênico minoritário encontrado somente nesta estação para a Região Nordeste.

Na primavera, os principais constituintes responsáveis pela diferenciação da estação foram o α -felandreno (**6**), um hidrocarboneto monoterpênico minoritário, o β -cariofileno (**26**), um hidrocarboneto sesquiterpênico majoritário e o α -humuleno (**29**), um hidrocarboneto sesquiterpênico minoritário, encontrados em maior concentração nesta estação para a Região Nordeste, bem como o δ -3-careno (**7**), um hidrocarboneto monoterpênico minoritário encontrado somente nesta estação para a Região Nordeste.

FIGURA 19 – CONSTITUINTES RESPONSÁVEIS PELA DIFERENCIAÇÃO DAS ESTAÇÕES PARA A REGIÃO NORDESTE



FONTE: A autora (2018).

As variações na composição dos óleos essenciais entre as estações da mesma região podem ser justificadas pelas diferentes condições climáticas, ou por períodos específicos como de florescência, de maior atividade de polinizadores e de maior ataque de patógenos ou herbívoros. Nota-se que as diferenças nos perfis dos óleos essenciais de plantas coletadas em regiões distintas normalmente são mais evidentes, dependendo de condições ambientais tais como a altitude, exposição

solar e tipo de solo, podendo mesmo estar associadas à existência de diferentes quimiotipos ou raças químicas (FIGUEIREDO et al., 2008).

As terpeno sintases (TPS) são as principais enzimas responsáveis por catalisar a formação dos terpenos, sendo capazes de formar apenas um composto ou até mesmo misturas complexas. No estudo de Tholl (2006), diversos genes de monoterpeno e sesquiterpeno sintases foram isolados e caracterizados de células e tecidos armazenadores. Alguns destes genes de TPS exibiram maior expressão em frutos e flores, enquanto outros foram especificamente expressados em determinados estágios de desenvolvimento e maturação de frutos. Assim, isto poderia explicar o aumento ou diminuição da concentração de alguns terpenos em diferentes estações do ano.

Os monoterpenos, particularmente, são frequentemente liberados por tecidos florais específicos em certos períodos para a atração de polinizadores. Esta poderia ser a razão do aumento no teor de monoterpenos durante as estações de inverno e primavera das três regiões estudadas, uma vez que o florescimento da *P. marginatum* começa com as primeiras chuvas (normalmente no mês Julho), podendo durar até o final da estação seca (final da primavera) (CROAT, 1978).

Em relação aos arilpropanoides, a fenilalanina amônia-liase (PAL) é a primeira enzima envolvida no seu metabolismo, e vem sendo amplamente estudada. As isoformas da PAL constituem uma família multigenética em diversas espécies de plantas, e cada um dos seus genes individuais exibe diferentes respostas ao estresse biótico e abiótico, sendo a sua expressão altamente variável nas regiões da planta e nos seus estágios de desenvolvimento, fato que poderia explicar as diferenças encontradas nos teores de arilpropanoides nas diferentes estações e regiões neste estudo (NANDA et al., 2017).

Existem poucos estudos de variação sazonal de óleos essenciais de outras espécies de *Piper*. Gasparetto et al. (2017) analisaram os óleos voláteis de *P. cernuum* Vell. e através de análise estatística, verificaram a existência de dois grupos, o primeiro (amostras de verão e primavera) foi caracterizado pela presença de (*E*)-diidroagarofurano e β -eudesmol. O segundo grupo (amostras de inverno e outono) foi caracterizado pela presença significativa de α -pineno, 4-*epi*-(*Z*)-diidroagarofurano e elemol. Marques e Kaplan (2011) estudaram os óleos essenciais das folhas frescas de *P. clausenianum* (Miq.) C.DC., que foram caracterizados pelo

seu alto teor de (*E*)-nerolidol (81,4%), linalol (5,2%), γ -muuroleno (1,1%), β -cariofileno (0,6%) e γ -elemeno (0,5%). Foi analisada a concentração do (*E*)-nerolidol em função da sazonalidade e verificou-se que a sua maior concentração ocorreu na primavera.

Apesar dos óleos essenciais da espécie coletada nas três regiões apresentarem arilpropanoides, os constituintes encontrados nelas são distintos. No Nordeste, tem-se a exalatacina, o 2,4,6-trimetoxi-1-[(1*Z*)-1-propenil]benzeno, a piper margina, a croweacina, a α -asarona e a β -asarona. No Norte e Centro-Oeste, tem-se o 3,4-metilenodioxipropiofenona, a elemicina, o dilapiol e a miristicina, estando presente, também, na Região Norte, o safrol na primavera e no verão.

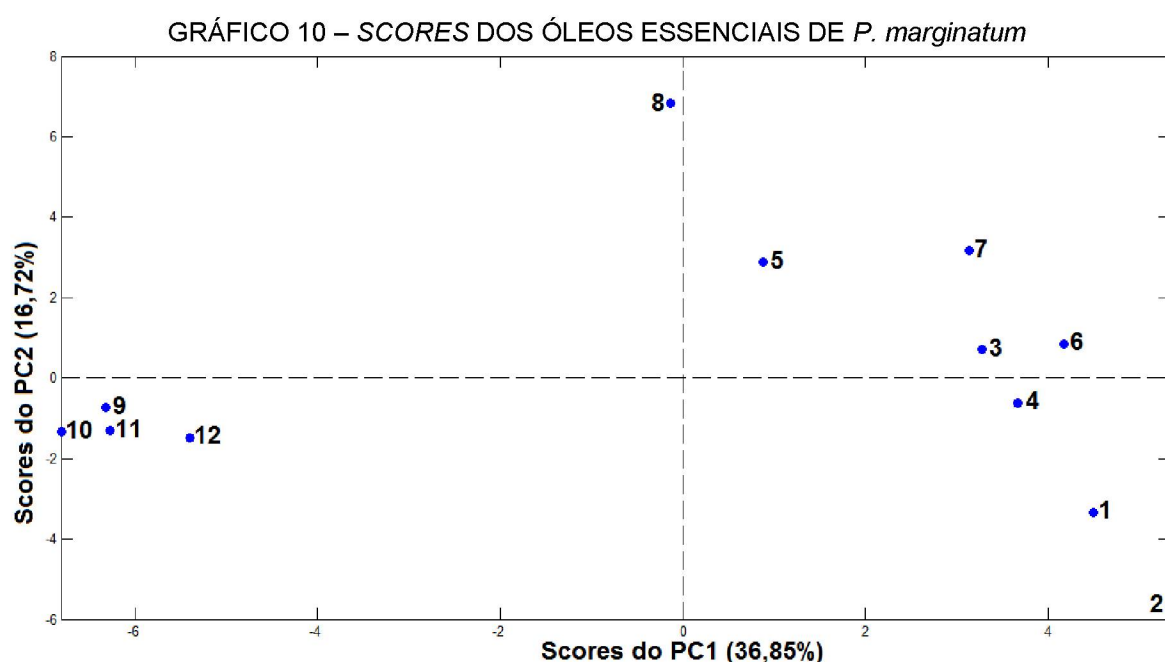
Já em relação aos sesquiterpenos, observa-se que são encontrados principalmente os mesmos compostos nas Regiões Norte e Centro-Oeste: biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol e germacreno D. Já no Nordeste, tem-se o biciclogermacreno, o β -cariofileno, o α -copaeno e o δ -elemeno como majoritários. Nas regiões Norte e Centro-Oeste observa-se, também, o monoterpreno oxigenado linalol, que se encontra ausente na Região Nordeste.

Estas diferenças entre as amostras das Regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste podem ser corroboradas através das análises quimiométricas (ACP e AAH). A ACP de todos os óleos essenciais analisados gerou 11 componentes, dos quais o primeiro e o segundo explicam 53,57% da variância, conforme o gráfico de *Scores* (GRÁFICO 10). A partir do gráfico de *Scores*, é possível observar uma clara diferenciação entre as amostras da Região Nordeste (9, 10, 11 e 12) das demais.

Como se pode observar no gráfico de *Loadings* (GRÁFICO 11, p. 61), os principais constituintes responsáveis por diferenciar a Região Nordeste das demais foram o α -pineno (**2**) e o β -pineno (**4**), dois hidrocarbonetos monoterpênicos minoritários presentes em todas as regiões, porém em maior concentração nas amostras da Região Nordeste. Outros constituintes responsáveis pela diferenciação da Região Nordeste foram a croweacina (**30**), um arilpropanoide, o ishwarano (**33**) e o γ -curcumeno (**36**), dois hidrocarbonetos sesquiterpênicos, bem como a piper margina (**63**), um arilpropanoide majoritário nas amostras de verão, outono e inverno e minoritário nas amostras de primavera, todos constituintes encontrados somente na Região Nordeste. Os constituintes β -asarona (**52**) e α -asarona (**62**), dois arilpropanoides, os quais são constituintes minoritários encontrados somente na

Região Nordeste, também contribuíram para diferenciar esta região das demais. Além disso, contribui para a diferenciação o 2,4,6-trimetoxi-[(1Z)-propenil]benzeno (**55**) e a exalatacina (**60**), dois arilpropanoides, constituintes majoritários encontrados somente na Região Nordeste.

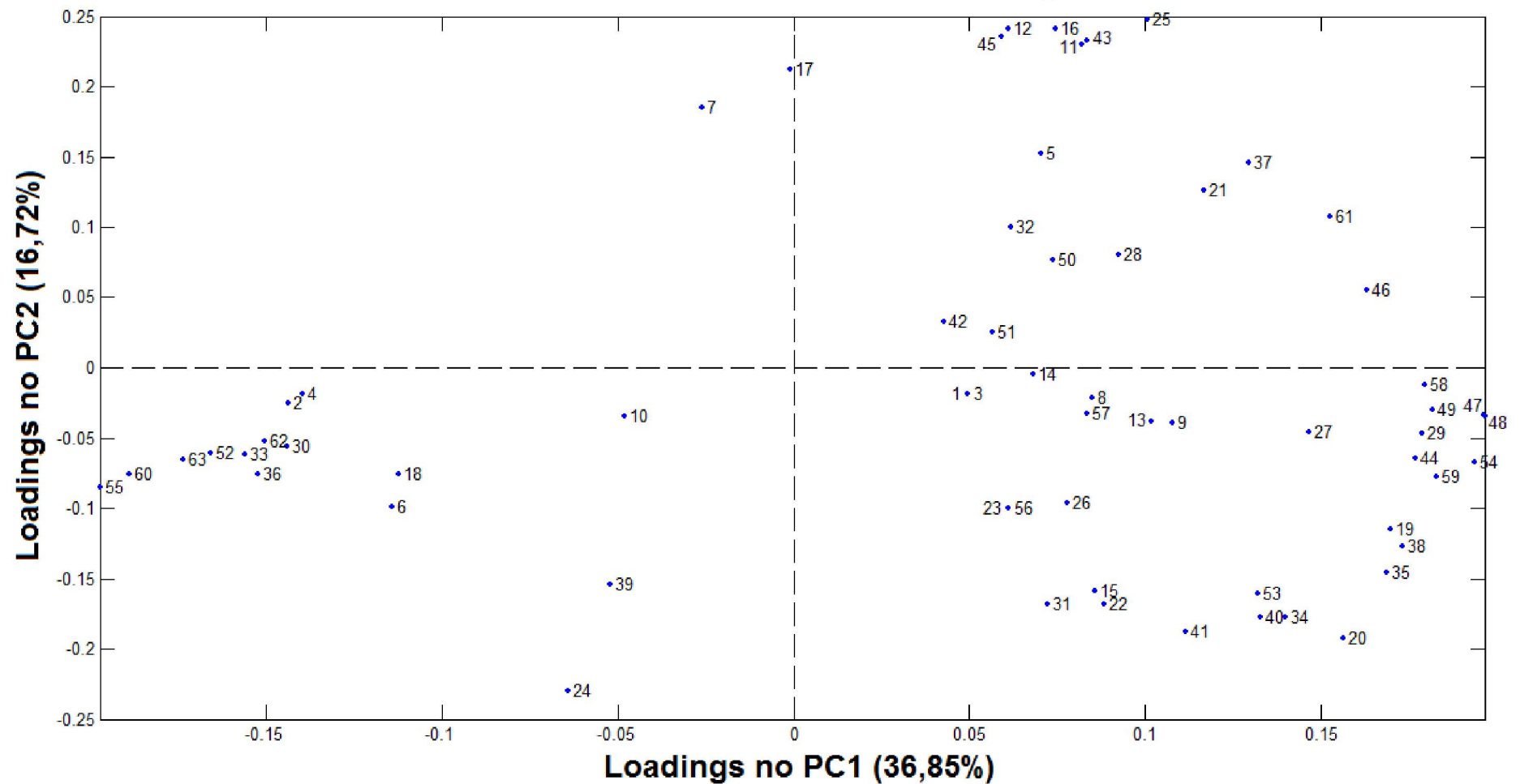
A partir da AAH (FIGURA 20, p. 62) é possível confirmar as semelhanças e diferenças observadas no ACP. Pode-se observar a presença de dois grupos, o primeiro agrupando as amostras das Regiões Centro-Oeste e Norte e o segundo agrupando as amostras da Região Nordeste.



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: 1 – Verão do Centro-Oeste. 2 – Outono do Centro-Oeste. 3 – Inverno do Centro-Oeste. 4 – Primavera do Centro-Oeste. 5 – Verão do Norte. 6 – Outono do Norte. 7 – Inverno do Norte. 8 – Primavera do Norte. 9 – Verão do Nordeste. 10 – Outono do Nordeste. 11 – Inverno do Nordeste. 12 – Primavera do Nordeste.

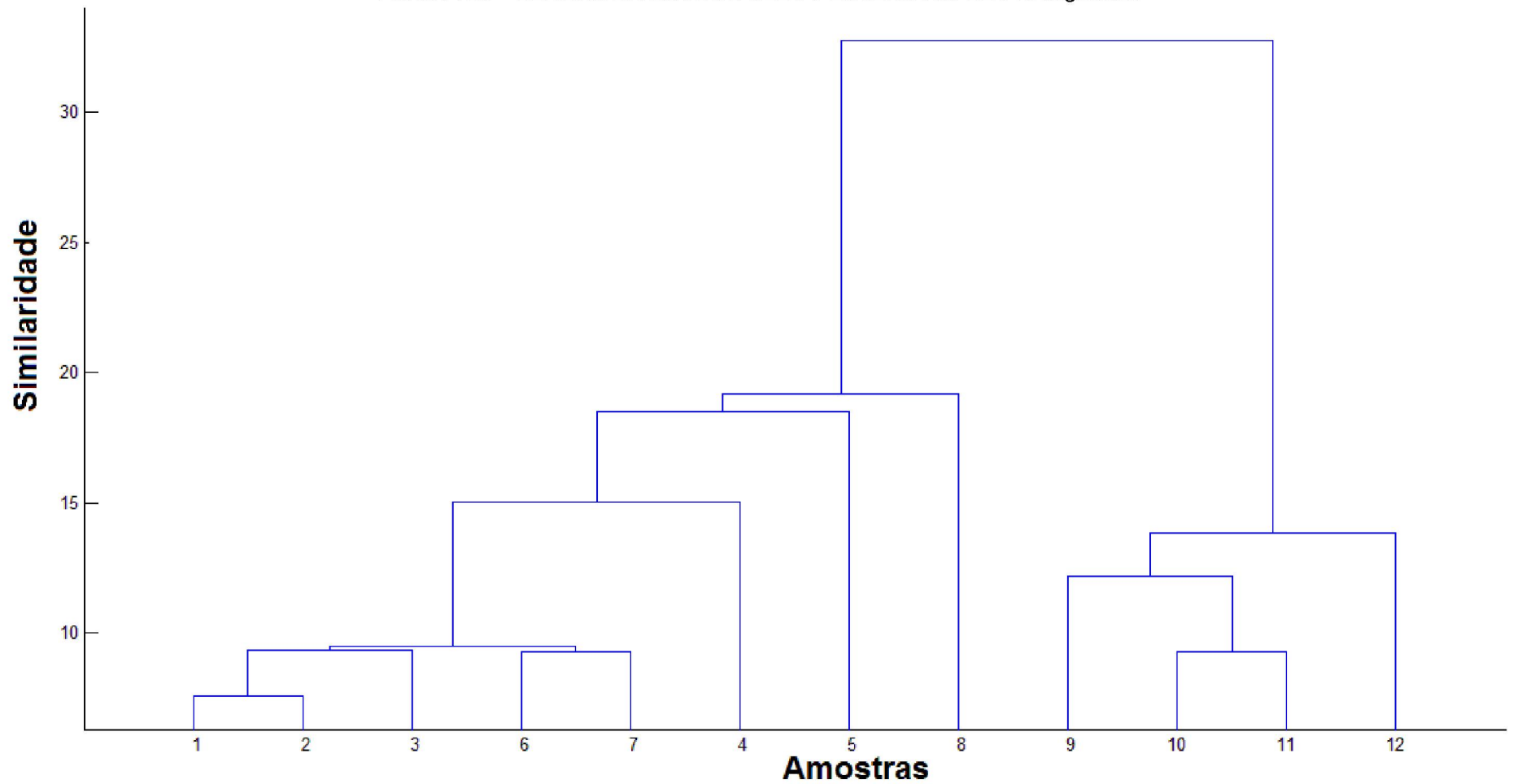
GRÁFICO 11 – LOADINGS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*



FONTE: A autora (2018).

NOTA: As numerações dos constituintes seguem as do Apêndice 1 (p. 84 e 85).

FIGURA 20 – DENDROGRAMA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: 1 – Verão do Centro-Oeste. 2 – Outono do Centro-Oeste. 3 – Inverno do Centro-Oeste. 4 – Primavera do Centro-Oeste. 5 – Verão do Norte. 6 – Outono do Norte. 7 – Inverno do Norte. 8 – Primavera do Norte. 9 – Verão do Nordeste. 10 – Outono do Nordeste. 11 – Inverno do Nordeste. 12 – Primavera do Nordeste.

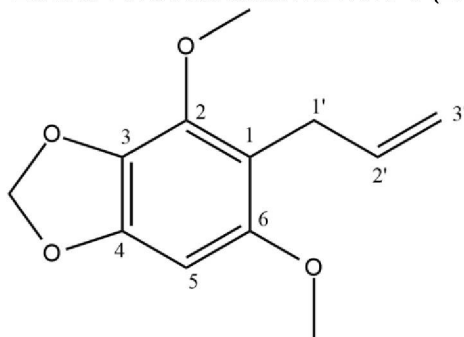
4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADAS

Os constituintes majoritários (exalatacina, piper margina e 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno) do óleo essencial de *P. marginatum* coletada na Região Nordeste (João Pessoa, PB) no verão foram purificados devido às dificuldades na identificação destes pelo IA e por comparação com a literatura (ADAMS, 2007), uma vez que dois deles possuíam o mesmo padrão de fragmentação e não havia relatos do seu IA na literatura. Desta forma, realizou-se a purificação por CCDA e CCDP, resultando nos constituintes isolados determinados como **A10-3**, **A10-2B** e **A10-2A**, cuja elucidação estrutural é descrita a seguir.

4.1.1 Determinação estrutural de **A10-3**

Os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e do mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância da substância **A10-3** (FIGURA 21) isolada do óleo essencial da *P. marginatum* estão descritos na TABELA 5.

FIGURA 21 – ESTRUTURA QUÍMICA DE **A10-3** (EXALATACINA)



FONTE: A autora (2018).

TABELA 5 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA **A10-3**

| (continua) | | | | | |
|------------|---|--|--|---|--------------------------------|
| Posição | A10-3 ^{13}C (δ) ^a | Exalatacina ^{13}C (δ) ^b | A10-3 ^1H (δ) ^a (mult., J em Hz) | Exalatacina ^1H (δ) ^b (mult., J em Hz) | ^{LD} J _{H-C} |
| 1 | 112,9 | 112,9 | | | |
| 2 | 142,0 | 142,0 | | | |
| 3 | 130,8 | 130,8 | | | |
| 4 | 147,5 | 147,5 | | | |
| 5 | 89,4 | 89,4 | 6,27 (s; 1H) | 6,27 (s, 1H) | 1, 3, 4, 6 |
| 6 | 152,9 | 152,8 | | | |
| 1' | 27,6 | 27,6 | 3,32 (d; 6,0; 2H) | 3,33 (d; 6,1; 2H) | 1, 2, 6, 2', 3' |
| 2' | 137,5 | 137,4 | 5,92 (m; 1H) | 5,87-5,97 (m, 1H) | 1, 1' |
| 3' | 113,9 | 113,9 | 4,95 (m; 2H) | 4,91-4,97 (m; 2H) | 1', 2' |

TABELA 5 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA **A10-3**

| Posição | (conclusão) | | | | |
|---------------------|--|--|---|---|------------------------------|
| | A10-3 ^{13}C (δ) ^a | Exalatacina ^{13}C (δ) ^b | A10-3 ^1H (δ) ^a (mult., J em Hz) | Exalatacina ^1H (δ) ^b (mult., J em Hz) | $^{\text{LD}}J_{\text{H-C}}$ |
| OCH ₃ -2 | 56,7 | 56,6 | 3,74 (s; 3H) | 3,74 (s; 3H) | 2 |
| OCH ₃ -6 | 59,7 | 59,7 | 3,95 (s; 3H) | 3,95 (s; 3H) | 6 |
| OCH ₂ O | 100,7 | 100,5 | 5,86 (s, 2H) | 5,86 (s; 2H) | 3, 4 |

FONTE: A autora (2018).

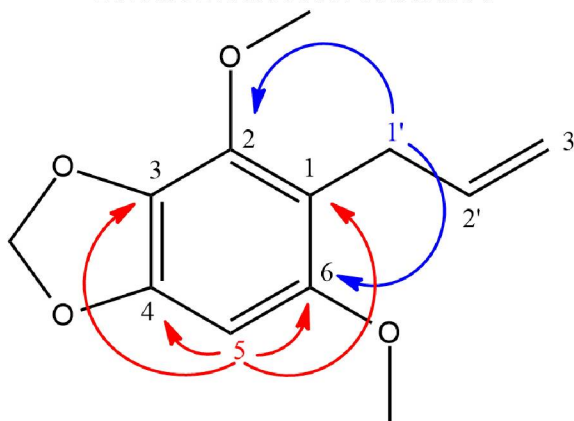
NOTA: ^aExperimento realizado a 400 MHz para ^1H e HMBC e 50 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . ^bMASUDA, T. et al. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3227-3228, 1991.

A análise do espectro RMN de ^1H (APÊNDICE 3, p. 87) mostra a presença de um sinal de hidrogênio aromático (H-5) em δ 6,27 ppm (s, 1H), característico de um anel aromático pentassubstituído. A presença de um duplete (H-1') em δ 3,32 ppm (d, J = 6,0 Hz, 2H,) e de dois multipletos nas regiões de δ 5,92 ppm (H-2') e δ 4,95 ppm (H-3'), correspondendo a um e dois hidrogênios, respectivamente, indicam a presença de uma cadeia alílica ligada ao anel aromático. Pode-se observar, também, o sinal dos hidrogênios do grupo metilenodióxi (OCH₂O) em δ 5,86 ppm (s, 2H) e dos dois grupos metoxila (OCH₃) em δ 3,74 ppm (OCH₃-2, s, 3H) e δ 3,95 ppm (OCH₃-6, s, 3H).

Através da análise do RMN de ^{13}C (APÊNDICE 4, p. 88), foi observada a presença de 12 átomos de carbono, sendo 8 sp^2 localizados na região de δ 89,4 ppm a δ 152,9 ppm. Pelo mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (APÊNDICE 5, p. 89), foi possível observar a correlação do sinal do hidrogênio aromático em δ 6,27 ppm (H-5) com o sinal do carbono em δ 89,4 ppm, bem como do sinal em δ 5,92 ppm (H-2') com o sinal do carbono em δ 137,5 ppm e do sinal em δ 4,95 ppm (H-3') com o sinal do carbono em δ 113,9 ppm, correspondendo aos carbonos da ligação dupla terminal.

As posições corretas da cadeia alílica, do grupo metilenodióxi e dos grupos metoxilas foram determinadas a partir do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (APÊNDICE 6, p. 90). O hidrogênio em δ 3,32 ppm (H-1') correlacionou a 3J com os sinais em δ 142,0 ppm (C-2) e 152,9 ppm (C-6). Estes dados definem a cadeia alílica entre os dois grupos metoxilas. O hidrogênio aromático (H-5) em δ 6,27 ppm correlacionou a 3J com os sinais em δ 112,9 ppm (C-1) e 130,8 ppm (C-3), e a 2J com os sinais em δ 147,5 ppm (C-4) e 152,9 ppm (C-6) (FIGURA 22).

FIGURA 22 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA PARA **A10-3**

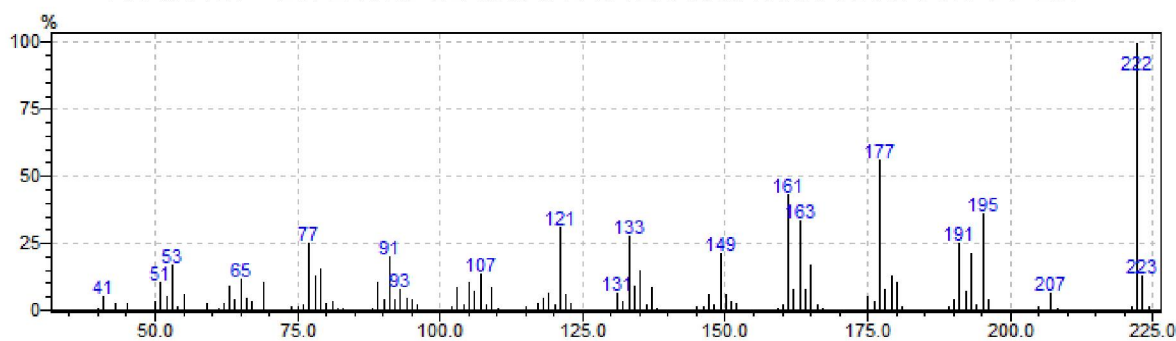


FONTE: A autora (2018).

A exaltacina já foi identificada em extratos das folhas de *P. sarmentosum* Roxb. (MASUDA et al., 1991), das folhas de *Crowea exalata* F.Muell. (Rutaceae) (BROPHY et al., 1997), das raízes de *P. marginatum* (SANTOS et al., 1998) e das raízes de *Codonopsis cordifolioidea* Kom. (sinônimo de *Codonopsis javanica* subesp. *javanica*) (Campanulaceae) (HU et al., 2012). Ela foi encontrada também nos óleos essenciais das folhas de *P. glabratum* (Kunth) Steud. (BRANQUINHO et al., 2017) e *P. marginatum* (ANDRADE et al., 2008; OLIVERO-VERBEL; GÜETTE-FERNANDEZ; STASHENKO, 2009; TANGARIFE-CASTAÑO et al., 2014).

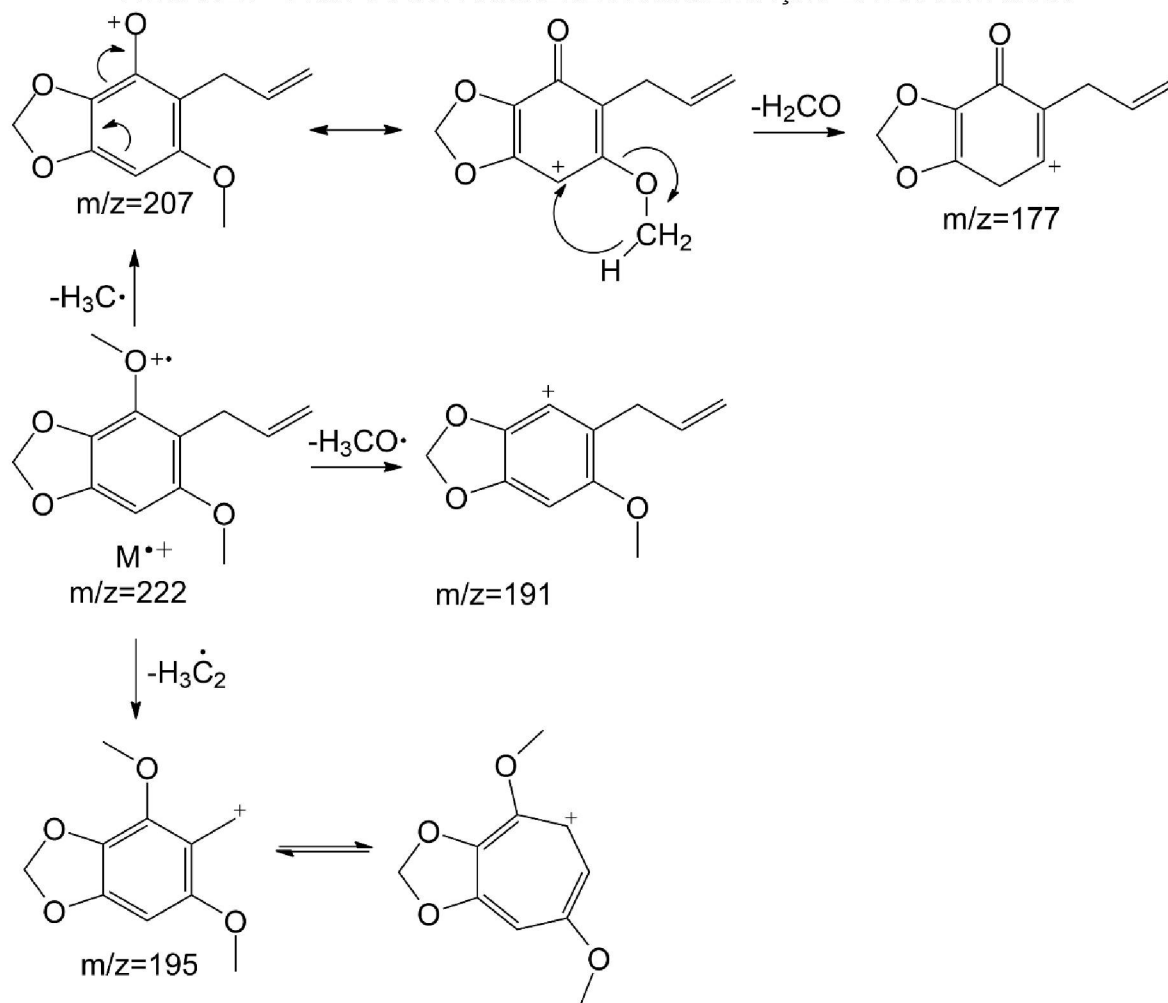
As FIGURAS 23 e 24 mostram o espectro de massas da exaltacina, bem como uma proposta de fragmentação.

FIGURA 23 – ESPECTRO DE MASSAS DA EXALTACINA OBTIDO NO CG-EM



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 24 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DA EXALATACINA

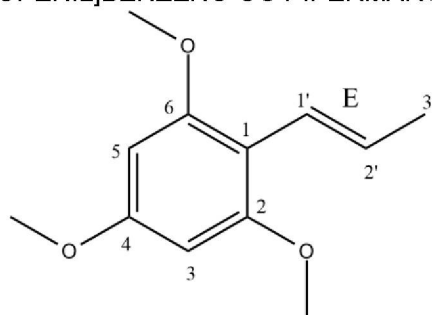


FONTE: A autora (2018).

4.1.2 Determinação de **A10-2B**

Os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e do mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância da substância **A10-2B** (FIGURA 25) isolada do óleo essencial da *P. marginatum* estão descritos na TABELA 6.

FIGURA 25 – ESTRUTURA QUÍMICA DE **A10-2B** (2,4,6-TRIMETOXI-1-[(1E)-1-PROPENIL]BENZENO OU PIPERMARGINA



FONTE: A AUTORA.

TABELA 6 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA **A10-2B**

| Posição | A10-2B ^{13}C (δ) ^a | Pipermargina ^{13}C (δ) ^b | A10-2B ^1H (δ) ^a (mult., J em Hz) | Pipermargina ^1H (δ) ^b (mult., J em Hz) | $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H-C}}$ |
|------------------------|--|--|--|--|-------------------------------------|
| 1 | 108,5 | 108,7 | | | |
| 2/6 | 158,8 | 159,0 | | | |
| 3/5 | 90,9 | 91,0 | 6,14 (s; 2H) | 6,15 (s; 2H) | 1, 2/6, 4, 1' |
| 4 | 159,4 | 159,6 | | | |
| 1' | 121,0 | 121,2 | 6,55 (dq; 16,0; 1,5; 1H) | 6,57 (dq; 16,0; 1,3; 1H) | 2/6, 2', 3' |
| 2' | 128,0 | 128,2 | 6,46 (dq; 16,0; 6,4; 1H) | 6,47 (dq; 16,0; 6,0; 1H) | 1, 1', 3' |
| 3' | 20,0 | 20,2 | 1,89 (dd; 6,4; 1,5; 3H) | 1,90 (dd; 6,0; 1,3; 3H) | 1, 2/6, 1', 2' |
| OCH ₃ (2/6) | 55,7 | 55,9 | 3,82 (s, 6H) | 3,83 (s, 6H) | 2/6 |
| OCH ₃ (4) | 55,3 | 55,5 | 3,81 (s, 3H) | 3,82 (s, 3H) | 4 |

FONTE: A autora (2018).

NOTA: ^aExperimento realizado a 400 MHz para ^1H e HMBC e 50 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . ^bSANTOS, B. V. O. et al. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1381-1384, 1998.

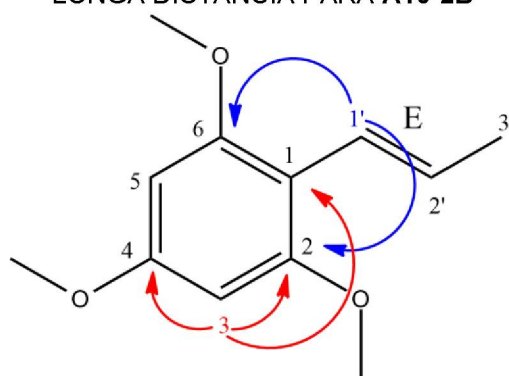
A análise do espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 7, p. 91) mostra a presença de um sinal de hidrogênio aromático (H-3 e H-5) em δ 6,14 ppm (s, 2H), correspondendo a dois hidrogênios, característico de um anel aromático tetrassubstituído. A presença de um duplo quarteto (H-2') em δ 6,46 ppm (dq, J = 16,0 e 6,0 Hz, 1H), bem como de dois duplos dupletos (H-1' e H-3'), um em δ 6,55 ppm (dd, J = 16,0 e 1,5 Hz, 1H) e outro em δ 1,89 ppm (dd, J = 6,4 e 1,5 Hz, 3H), indicam a presença de uma cadeia propenílica, cuja ligação dupla é de configuração *E*, baseado nas constantes de acoplamento observadas. Pode-se observar também, os sinais dos três grupos metoxila (OCH_3) em δ 3,81 ppm (OCH_3 -4, s, 3H) e em δ 3,82 ppm (OCH_3 -2 e OCH_3 -6, s, 6H).

Através da análise de RMN de ^{13}C (APÊNDICE 8, p. 92), foi observada a presença de 12 átomos de carbono, sendo 8 sp^2 localizados na região de δ 90,9

ppm a δ 159,4 ppm. Pelo mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (APÊNDICE 9, p. 93), foi possível observar a correlação do sinal dos hidrogênios aromáticos em δ 6,14 ppm (H-3 e H-5) com o sinal do carbono em δ 90,9 ppm, bem como do sinal em δ 6,55 ppm (H-1') com o sinal do carbono em δ 121,0 ppm e do sinal em δ 6,46 ppm (H-2') com o sinal do carbono em δ 128,0 ppm.

As posições corretas da cadeia propenílca e dos grupos metoxila foram determinadas a partir do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (APÊNDICE 10, p. 94). O hidrogênio em δ 6,55 ppm (H-1') correlacionou a 3J com o sinal em δ 158,8 ppm (C-2 e C-6). Os hidrogênios aromáticos (H-3 e H-5) em δ 6,14 ppm correlacionaram a 3J com o sinal em δ 108,5 ppm (C-1) e a 2J com os sinais em δ 158,8 ppm (C-2 e C-6) e 159,4 ppm (C-4) (FIGURA 26).

FIGURA 26 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA PARA **A10-2B**



FONTE: A autora (2018).

A piper margina foi isolada anteriormente dos extratos das raízes de *P. marginatum* (SANTOS et al., 1998). Baseado na literatura, este composto não foi identificado em óleos essenciais e, portanto, o seu isolamento e identificação aqui neste trabalho permitiu determinar seu IA como sendo 1720.

As FIGURAS 27 e 28 mostram o espectro de massas da piper margina, bem como uma proposta de fragmentação.

FIGURA 27 – ESPECTRO DE MASSAS DA PIPERMARGINA OBTIDO NO CG-EM

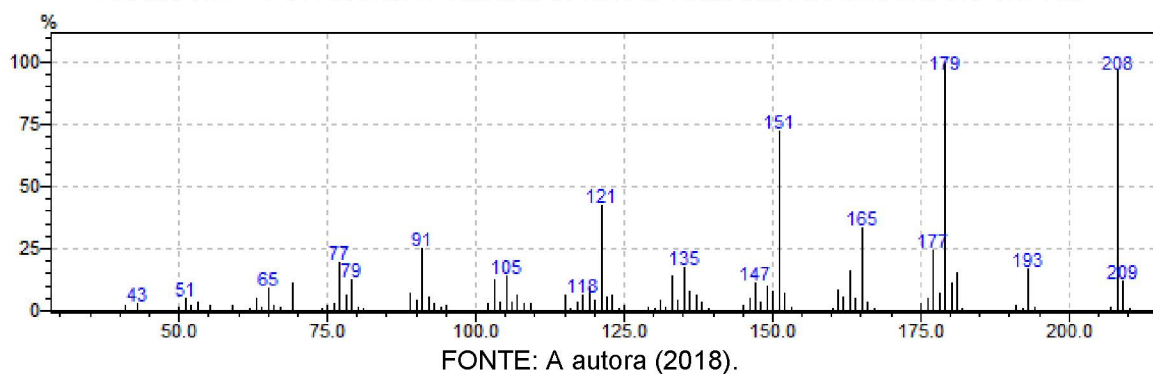
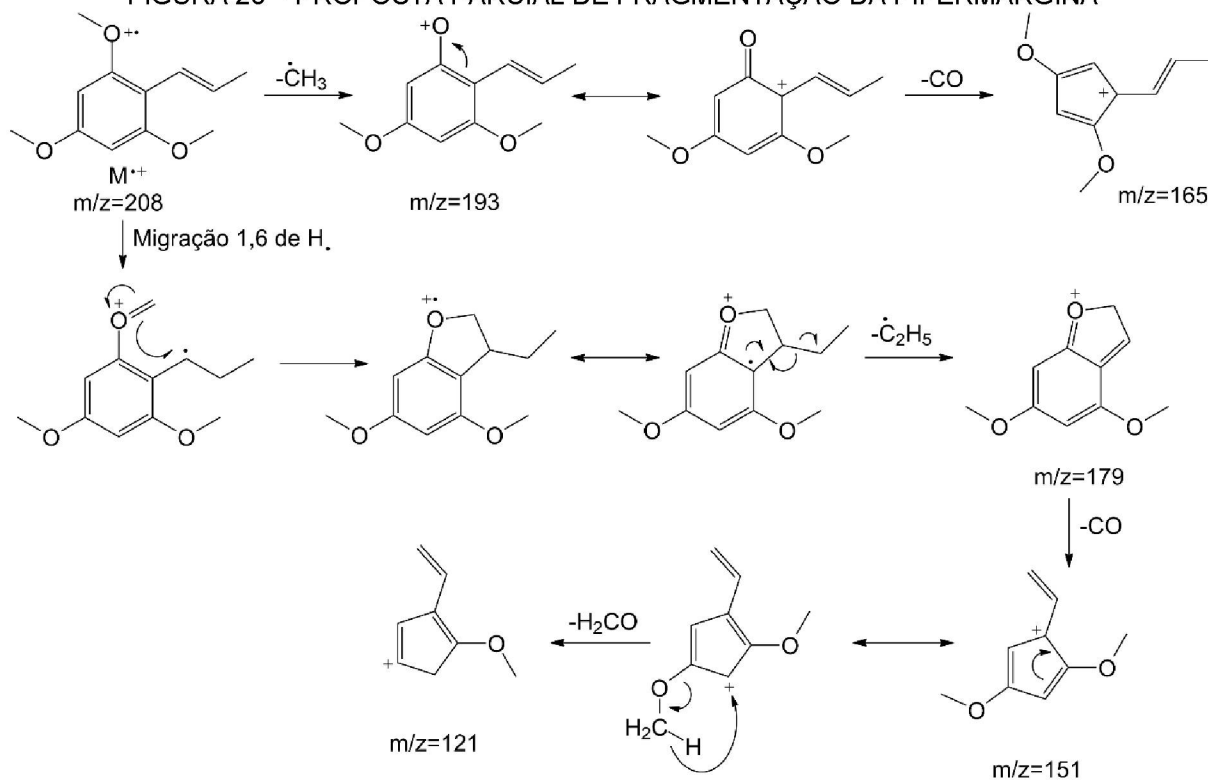
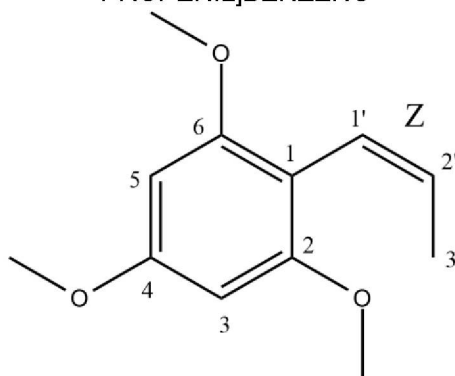


FIGURA 28 – PROPOSTA PARCIAL DE FRAGMENTAÇÃO DA PIPERMARGINA



4.1.3 Determinação de **A10-2A**

Os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e do mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância da substância **A10-2A** (FIGURA 29) isolada do óleo essencial da *P. marginatum* estão descritos na TABELA 7.

FIGURA 29 - ESTRUTURA QUÍMICA DE **A10-2A** (2,4,6-TRIMETOXI-1-[(1Z)-1-PROPENIL]BENZENO

FONTE: A autora (2018).

TABELA 7 – DADOS DE RMN DE ^1H , DE ^{13}C E MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA (HMBC) PARA A SUBSTÂNCIA **A10-2A**

| Posição | A10-2A ^{13}C (δ) ^a | 2,4,6-trimetoxi-1- [(1Z)-1-propenil] benzeno ^{13}C (δ) ^b | A10-2A ^1H (δ) ^a (mult., J em Hz) | 2,4,6-trimetoxi-1- [(1Z)-1-propenil] benzeno ^1H (δ) ^b (mult., J em Hz) | $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H-C}}$ |
|------------------------|---|---|--|--|-------------------------------------|
| 1 | 107,6 | 107,4 | | | |
| 2/6 | 158,3 | 158,2 | | | |
| 3/5 | 90,6 | 90,3 | 6,16 (s; 2H) | 6,14 (s; 2H) | 1, 2/6, 4 |
| 4 | 160,5 | 160,3 | | | |
| 1' | 120,6 | 120,7 | 6,19 (dq; 11,3; 1,7; 1H) | 6,17 (dq; 11,0; 1,8; 1H) | 1, 2/6, 3' |
| 2' | 128,5 | 128,6 | 5,89 (dq; 11,3; 6,8; 1H) | 5,86 (dq; 11,0; 6,8; 1H) | 1, 3' |
| 3' | 15,6 | 15,4 | 1,57 (dd; 6,8; 1,7; 3H) | 1,55 (dd; 6,8; 1,8; 3H) | 1, 1', 2' |
| OCH ₃ (2/6) | 55,7 | 55,5 | 3,81 (s; 6H) | 3,79 (s; 6H) | 2/6 |
| OCH ₃ (4) | 55,3 | 55,2 | 3,83 (s; 3H) | 3,81 (s; 6H) | 4 |

FONTE: A autora (2018).

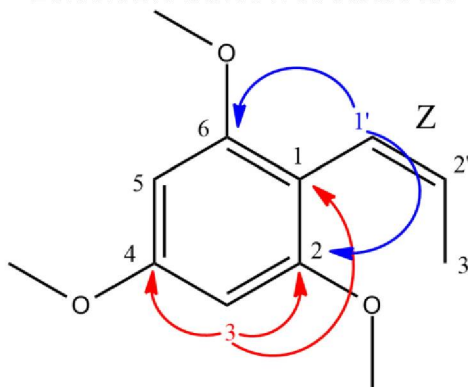
NOTA: ^aExperimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 . ^bCHAVES, M. C.; SANTOS, B. V. O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. *Fitoterapia*, v. 73, p. 547-549, 2002.

A análise do espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 11, p. 95) mostra a presença de um sinal de hidrogênio aromático (H-3 e H-5) em δ 6,16 ppm (s, 2H), correspondendo a dois hidrogênios, característico de um anel aromático tetrassubstituído. A presença de um duplo quarteto (H-2') em δ 5,89 ppm (dq, J = 11,3 e 6,8 Hz, 1H), bem como de dois duplos dupletos (H-1' e H-3'), um em δ 6,19 ppm (dd, J = 11,3 e 1,7 Hz, 1H) e outro em δ 1,57 ppm (dd, J = 6,8 e 1,7 Hz, 3H), indicam a presença de uma cadeia propenílica, cuja ligação dupla é de configuração Z, baseado nas constantes de acoplamento observadas. Pode-se observar, também, os sinais dos três grupos metoxila (OCH₃) em δ 3,81 ppm (OCH₃-2 e OCH₃-6, s, 6H) e em δ 3,83 ppm (s, 3H).

Através da análise do RMN de ^{13}C (APÊNDICE 12, p. 96), foi observada a presença de 12 carbonos, sendo 8 carbonos sp^2 localizados na região de δ 90,6 ppm a δ 160,5 ppm. Pelo mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (APÊNDICE 13, p. 97), foi possível observar a correlação do sinal dos hidrogênios aromáticos em δ 6,16 ppm (H-3 e H-5) com o sinal do carbono em δ 90,6 ppm, bem como do sinal em δ 6,19 ppm (H-1') com o sinal do carbono em δ 120,6 ppm e do sinal em δ 5,89 ppm (H-2') com o sinal do carbono em δ 128,5 ppm.

As posições corretas da cadeia propenílica e dos grupos metoxila foram determinadas a partir do mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (APÊNDICE 14, p. 98). O hidrogênio em δ 6,18 ppm (H-1') correlacionou a 3J com o sinal em δ 158,3 ppm (C-2 e C-6). Os hidrogênios aromáticos (H-3 e H-5) em δ 6,16 ppm correlacionaram a 3J com o sinal em δ 107,6 ppm (C-1) e a 2J com os sinais em δ 158,3 ppm (C-2 e C-6) e 160,5 ppm (C-4) (FIGURA 30).

FIGURA 30 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA PARA **A10-2A**

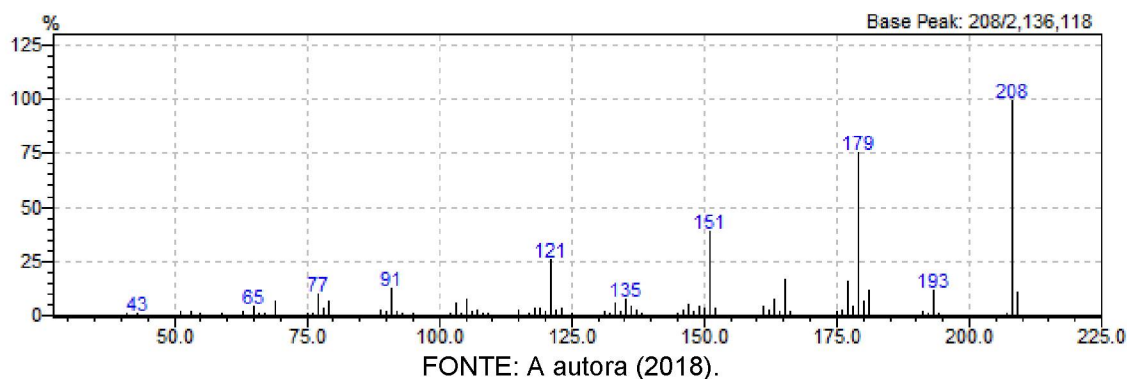


FONTE: A autora (2018).

O 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno foi isolado anteriormente dos extratos dos frutos de *Piper marginatum* (CHAVES; SANTOS, 2002). Baseado na literatura, este composto não foi identificado em óleos essenciais e, portanto, o seu isolamento e identificação aqui neste trabalho permitiu determinar seu IA como sendo 1629.

A FIGURA 31 mostra o espectro de massas obtido no CG-EM do 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno. A fragmentação do composto é análoga à da piper margina (FIGURA 28, p. 69).

FIGURA 31 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO NO CG-EM DO CONSTITUINTE A10-2A



4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os óleos essenciais de *P. marginatum* foram submetidos a análises de suas atividades antimicrobianas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo (TABELA 8), e as Concentrações Fungicida e Bactericida Mínimas (CFM e CBM), concentrações mínimas responsáveis pela morte de pelo menos 99,9% dos inóculos iniciais (TABELA 9), foram avaliadas contra 7 microrganismos.

Aligiannis et al. (2001) classifica as atividades antimicrobianas de óleos essenciais como fortes quando o CIM é de até 0,5 mg mL⁻¹, como moderadas quando o CIM se encontra entre 0,6 e 1,5 mg mL⁻¹ e como fracas quando o CIM é maior que 1,6 mg mL⁻¹. Neste trabalho, foram avaliadas atividades até 2,0 mg mL⁻¹, sendo considerados inativos os óleos essenciais com valores de CIM acima disto.

Desta maneira, para o fungo *C. albicans*, verificou-se que os óleos essenciais provenientes da planta coletada nas Regiões Centro-Oeste e Norte inibiram fortemente o microrganismo (CIM = 0,5 mg mL⁻¹). Já para os óleos essenciais da Região Nordeste, houve uma inibição fraca (CIM = 2,0 mg mL⁻¹). Nota-se que os óleos da estação de outono das três regiões não inibiram este microrganismo, bem como o da estação de primavera da Região Centro-Oeste. Duarte et al. (2005) também estudaram a atividade do óleo essencial de *P. marginatum* contra o fungo *C. albicans* e verificaram não haver inibição.

TABELA 8 – ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*

| Amostra | | Microrganismos (mg mL ⁻¹) | | | | | | |
|-------------------------|-----------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Região | Estação | <i>Candida albicans</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella choleraesuis</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| Centro-Oeste | Verão | 0,5 | 0,25 | * | 1,0 | 2,0 | * | * |
| | Outono | * | 0,25 | * | 1,0 | 2,0 | * | * |
| | Inverno | 0,5 | 0,5 | * | 2,0 | 1,0 | 2,0 | * |
| | Primavera | * | 0,5 | * | 2,0 | 2,0 | * | * |
| Norte | Verão | 0,5 | 1,0 | * | * | 1,0 | * | * |
| | Outono | * | 0,25 | * | 2,0 | 2,0 | * | * |
| | Inverno | 0,5 | 0,5 | * | 2,0 | 1,0 | * | * |
| | Primavera | 0,5 | 2,0 | * | * | 2,0 | 2,0 | * |
| Nordeste | Verão | 2,0 | * | * | * | 1,0 | * | * |
| | Outono | * | * | * | * | 1,0 | * | * |
| | Inverno | 2,0 | * | * | * | 0,25 | * | * |
| | Primavera | 2,0 | * | * | * | 2,0 | * | * |
| Referência ^a | | 0,002 | 0,004 | 0,062 | 0,008 | 0,004 | 0,004 | 0,008 |

FONTE: A autora (2018).

NOTA: ^aAntimicrobianos de referência: nistatina para *C. albicans* e cloranfenicol para as bactérias. *CIM > 2,0 mg mL⁻¹.TABELA 9 – ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS (CONCENTRAÇÕES FUNGICIDA E BACTERICIDA MÍNIMAS) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*

| Amostra | | Microrganismos (mg mL ⁻¹) | | |
|--------------|-----------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Região | Estação | <i>Candida albicans</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Centro-Oeste | Verão | 2,0 | 0,25 | |
| | Outono | | 0,25 | |
| | Inverno | 2,0 | | 2,0 |
| | Primavera | | | |
| Norte | Verão | 2,0 | 1,0 | |
| | Outono | | | |
| | Inverno | 1,0 | 0,5 | |
| | Primavera | 0,5 | | |

FONTE: A autora (2018).

Já para a bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, houve inibição por todos os óleos das Regiões Centro-Oeste e Norte, não havendo inibição pelos óleos da Região Nordeste. Os óleos das estações de verão e outono da Região Centro-Oeste, bem como de outono da Região Norte inibiram fortemente o microrganismo (CIM = 0,25 mg mL⁻¹). Estes óleos essenciais com maior atividade são caracterizados pela alta concentração em hidrocarbonetos sesquiterpênicos, cerca de 50% e em sesquiterpenos oxigenados, aproximadamente 30%.

Em relação à bactéria Gram-positiva *S. aureus*, houve inibição por todos os óleos da Região Centro-Oeste e pelos óleos do outono e inverno da Região Norte, não havendo, novamente, inibição pelos óleos da Região Nordeste. Os óleos das estações de verão e outono da Região Centro-Oeste inibiram moderadamente o microrganismo (CIM = 1,0 mg mL⁻¹).

Para a bactéria Gram-negativa *E. coli*, todos os óleos apresentaram inibição. O maior valor de inibição foi para o óleo essencial da estação de inverno da Região Nordeste, que inibiu fortemente o microrganismo (CIM = 0,25 mg mL⁻¹). Este óleo essencial apresenta um perfil químico composto principalmente por arilpropanoides (cerca de 50%), seguido de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (aproximadamente 30%) e hidrocarbonetos monoterpênicos em menor quantidade (15%). Duarte et al. (2007) também estudaram a atividade do óleo essencial de *P. marginatum* contra dois sorotipos da bactéria *E. coli*, obtendo valores de CIM = 0,9 mg mL⁻¹ para a bactéria enteropatogênica (EPEC 0031-2) e de CIM = 0,7 mg mL⁻¹ para a bactéria produtora de toxina shiga (STEC 0157).

Em relação à bactéria Gram-negativa *Salmonella choleraesuis*, apenas os óleos da estação de inverno da Região Centro-Oeste e da estação da primavera da Região Norte apresentaram inibição fraca (CIM = 2,0 mg mL⁻¹) do microrganismo.

Não houve inibição das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *S. epidermides* por nenhum dos óleos essenciais.

O óleo essencial da estação de primavera da Região Norte apresentou CIM igual à CFM (0,5 mg mL⁻¹) contra o fungo *C. albicans*. Já os óleos essenciais das estações de verão e inverno da Região Centro-Oeste apresentaram CIM igual à CBM (0,25 mg mL⁻¹) contra a bactéria *B. subtilis*. Nota-se, ainda, que a atividade bactericida ocorreu apenas contra as bactérias Gram-positivas e contra o fungo *C. albicans*.

O óleo essencial mais ativo foi o da estação de inverno da Região Centro-Oeste, que inibiu 5 microrganismos, sendo o fungo *C. albicans* e a bactéria *B. subtilis* fortemente inibidos ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). O menos ativo foi o da estação de primavera da Região Nordeste, que inibiu apenas fracamente os microrganismos *C. albicans* e *E. coli* ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Os óleos essenciais da Região Centro-Oeste, bem como os óleos das estações de outono e inverno da Região Norte, apresentaram uma maior inibição contra as bactérias Gram-positivas *B. subtilis* e *S. aureus*. Já os óleos da Região Nordeste, bem como o óleo da primavera da Região Norte apresentaram maior inibição contra as bactérias Gram-negativas.

Desta maneira, parece haver uma relação entre o teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e arilpropanoides com a inibição preferencial de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Os óleos essenciais compostos principalmente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos demonstram inibir principalmente as bactérias Gram-positivas, enquanto os ricos em arilpropanoides demonstraram inibir preferencialmente as Gram-negativas.

Normalmente as atividades dos óleos essenciais dependem dos seus compostos majoritários, sendo os constituintes nas formas oxigenadas mais bioativos (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). As atividades dos arilpropanoides dependem do tipo e número de substituintes nos anéis aromáticos (PAULI; KUBECZKA, 2010). Alguns compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de *P. marginatum* estudados, como o biciclogermacreno, o β -cariofileno, a exalatacina e o espatulenol já tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas individualmente (DAHAM et al., 2015; NGASSAPA et al., 2016; SANTOS et al., 2013).

Desta maneira, as atividades antimicrobianas aqui avaliadas provavelmente têm relação com as propriedades de seus constituintes majoritários e interações entre eles, sejam elas de sinergismo ou antagonismo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi avaliada a variação sazonal e regional do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq. coletada em três regiões (Centro-Oeste, Norte e Nordeste) nas quatro estações do ano.

Os rendimentos obtidos nas extrações dos óleos essenciais apresentaram diferenças (0,15 a 1,74%), porém encontram-se dentro dos valores reportados na literatura para a espécie. Em todas as estações, os menores rendimentos encontrados foram os dos óleos da espécie coletada na Região Centro-Oeste.

Foram identificados 63 constituintes nos óleos essenciais pertencentes às classes dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados, hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados e arilpropanoides. Observou-se que os perfis químicos dos óleos essenciais do material botânico coletado nas Regiões Norte e Centro-Oeste apresentaram características semelhantes, tendo como majoritários os sesquiterpenos biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol e germacreno D, bem como os arilpropanoides 3,4-metilenodioxipropiofenona, miristicina e elemicina. Já as amostras da Região Nordeste apresentaram-se diferentes das demais, com os arilpropanoides exalatacina, piperargina e 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno como majoritários, bem como os hidrocarbonetos sesquiterpênicos biciclogermacreno e β -cariofileno.

Foram isolados três arilpropanoides (exalatacina, piperargina e 2,4,6-trimetoxi-1-[(1Z)-1-propenil]benzeno) do óleo essencial da planta coletada na Região Nordeste da estação de verão. Estes compostos foram identificados por CG-EM e RMN. Este é o primeiro relato da ocorrência dos dois últimos constituintes em óleos essenciais, sendo seus IAs determinados pela primeira vez como sendo 1720 e 1629, respectivamente.

As semelhanças e diferenças observadas nas amostras das diferentes regiões puderam ser corroboradas pela ACP e AAH, nas quais nota-se uma diferenciação clara entre as amostras da Região Nordeste e as das Regiões Centro-Oeste e Norte. Na AAH, observa-se a existência de dois grandes grupos, os da Região Nordeste e os das Regiões Centro-Oeste e Norte.

Em relação às variações sazonais, nota-se que, para uma mesma região, houve diferenças em sua maioria quantitativas, o que pode ser evidenciado na ACP.

Na literatura são encontrados diversos estudos de óleos essenciais de *P. marginatum* de diferentes regiões envolvendo a identificação dos constituintes majoritários. No entanto, não há nenhum estudo de sazonalidade.

As análises antimicrobianas mostraram que os óleos essenciais mais ativos foram os das Regiões Centro-Oeste e Norte. As maiores atividades contra o fungo *C. albicans* foram de CIM = 0,5 mg mL⁻¹, sendo que a amostra da estação de primavera da Região Norte apresentou potencial fungicida. Contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, as maiores atividades (CIM = 0,25 mg mL⁻¹) foram dos óleos essenciais das estações de verão e outono da Região Centro-Oeste, que também apresentaram potencial bactericida, bem como dos óleos da estação de outono da Região Norte. Contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, todos os óleos apresentaram inibição, sendo a mais significativa pelo óleo essencial da estação de inverno da Região Nordeste (CIM = 0,25 mg mL⁻¹). As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais têm relação com os tipos de metabólitos secundários presentes, sendo que é observada uma tendência dos óleos essenciais que possuem maior teor em sesquiterpenos a apresentarem maior atividade contra bactérias Gram-positivas, enquanto que os óleos que possuem maior teor em arilpropanoides aparentam possuir maior atividade contra bactérias Gram-negativas.

Observa-se uma diferença clara nas atividades antimicrobianas entre as regiões, bem como entre as estações. Isto ressalta a importância em se estudar óleos essenciais de plantas coletadas em diferentes localidades, bem como em diferentes estações do ano.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 1, p. 197–208, 2008.
- AUTRAN, E. S. et al. Chemical composition , oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2284–2288, 2009.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: BERGER, R. G. (Ed.). **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. 1. ed. Berlin: Springer, 2007. p. 43–86.
- BRANQUINHO, L. S. et al. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 372–378, 2017.
- BROPHY, J. J. et al. Essential Oils of the Genus *Crowea* (Rutaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 4, p. 401–409, 1997.
- BRÚ, J.; GUZMAN, J. D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 6, p. 767–779, 2016.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd., 2011. p. 203–238.

CHAVES, M. C. DE O.; SANTOS, B. V. DE O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 547–549, 2002.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, 2017.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard**. 3. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard**. 9. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CROAT, T. B. **Flora of Barro Colorado Island**. Disponível em: <<https://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/croat/specie/Piper%marginatum,e,n>>. Acesso em: 23 set. 2018.

DAHAM, S. S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. Baffins Lane: John Wiley & Sons, Ltd., 2002.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 2007.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213–226, 2008.

GASPARETTO, A. et al. Seasonal variation in the chemical composition , antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. **Industrial Crops & Products**, v. 95, p. 256–263, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

HAYEK, S. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Antimicrobial Natural Products. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. [s.l.] Formatex Research Center, 2013. p. 910–921.

HU, Q. et al. Phenylpropanoids from the Roots of *Codonopsis cordifolioides* and Their Biological Activities. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 1, p. 278–280, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–24, 2012.

JARAMILLO-COLORADO, B. et al. Comparative study of volatile composition and biological activities of essential oil from Colombian *Piper marginatum* Jacq. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 5, p. 343–354, 2015.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Flora do Brasil 2020 - Algas, Fungos e Plantas**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12735>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A. Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 6, p. 676–687, 2016.

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Erebidæ) at the initial stage of development. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 2018.

MARQUES, A. M.; KAPLAN, M. A. C. Seasonal Evaluation and Chemical Composition of Volatile Fractions from *Piper clausenianum* by Hydrodistillation and SPME. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 15–19, 2011.

MASUDA, T. et al. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3227–3228, 1991.

MORAES, M. M. et al. Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 3, p. 270–277, 2014.

NANDA, S. et al. Metabolic Engineering of PhenylPropanoids in Plants. In: JHA, S. (Ed.). **Transgenesis and Secondary Metabolism**. Cham: Springer, 2017. p. 485–510.

NGASSAPA, O. D. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Geniosporum rotundifolium* Briq and *Haumaniastrum villosum* (Bene) AJ Paton (Lamiaceae) Essential Oils from Tanzania. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 107–113, 2016.

NIST. **NIST Livro de Química na Web, SRD 69**. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/>>. Acesso em: 12 set. 2018.

OLIVERO-VERBEL, J.; GÜETTE-FERNANDEZ, J.; STASHENKO, E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, n. 5, p. 419–427, 2009.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2016.

PAULI, A.; KUBECZKA, K.-H. Antimicrobial Properties of Volatile Phenylpropanes. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 9, p. 1387–1394, 2010.

PERIGO, C. V. et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 528–539, 2016.

RAMOS, L. S. et al. Essential oil of *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 712–741, 1986.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RIBEIRO, N.; CAMARA, C.; RAMOS, C. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 76, n. 1, p. 71–76, 2016.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.

SANTANA, H. T. et al. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, p. 105–111, 2015.

SANTOS, B. V. O. de et al. Phenylalkanoïds from *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1381–1384, 1998.

SANTOS, T. G. et al. Chemical Characterization of Essential Oils from *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) and Antibacterial Activity of their Major Compounds. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 164–170, 2013.

SILVA, J. K. DA et al. Essential Oils from Neotropical *Piper* Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

SILVA, J. K. R. DA et al. Phenylpropanoid-rich Essential Oils of *Piper* Species from the Amazon and their Antifungal and Anti-cholinesterase Activities. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 12, p. 1907–1911, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2007. p. 467–495.

SOUTO, R. N. P. et al. Insecticidal Activity of *Piper* Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 510–517, 2012.

SOUZA, A. M. DE; POPPI, R. J. Experimento Didático de Quimiometria para Análise Exploratória de Óleos Vegetais Comestíveis por Espectroscopia no Infravermelho médio e Análise de Componentes Principais: Um Tutorial, Parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHA, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2010.

TANGARIFE-CASTAÑO, V. et al. Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 3, p. 221–227, 2014.

TEPE, E. **Herbario Virtual Austral Americano**. Disponível em: <<https://herbariovaa.org/taxa/index.php?taxon=29715>>. Acesso em: 4 out. 2017.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 297–304, 2006.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

APÊNDICE 1 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. marginatum* COLETADA NAS REGIÕES CENTRO-OESTE, NORTE E NORDESTE NAS QUATRO ESTAÇÕES

(continua)

| | Constituinte | IR ^a | IR ^b | CENTRO-OESTE ^d | | | | NORTE ^d | | | | NORDESTE ^d | | | |
|----|--|-----------------|-----------------|---------------------------|------------|------------|-----------|--------------------|------------|------------|-----------|-----------------------|-----------|------------|------------|
| | | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera | Verão | Outono | Inverno | Primavera | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| 1 | α-tujeno | 924 | 924 | | | | 0,10±0,17 | | | | | | | | |
| 2 | α-pineno | 933 | 932 | 0,40±0,18 | 0,49±0,16 | 1,04±0,03 | 0,87±0,31 | 0,96±0,57 | 0,60±0,22 | 1,14±0,53 | 1,79±0,38 | 0,34±0,20 | 3,12±0,79 | 6,56±1,38 | 5,64±2,27 |
| 3 | sabineno | 973 | 969 | | | | 0,14±0,12 | | | | | | | | |
| 4 | β-pineno | 976 | 974 | 0,27±0,13 | 0,39±0,09 | 0,72±0,02 | 0,67±0,11 | 0,64±0,27 | 0,44±0,15 | 0,89±0,29 | 1,41±0,41 | 0,22±0,16 | 2,03±0,60 | 4,77±1,10 | 3,89±1,53 |
| 5 | mirreno | 992 | 988 | | | 0,44±0,05 | 0,32±0,06 | | | 0,14±0,04 | 0,35±0,17 | | | | |
| 6 | α-felandreno | 1005 | 1002 | 0,54±0,14 | | 0,83±0,14 | 2,23±0,68 | | | | | 0,15±0,25 | 2,35±0,55 | 2,36±0,64 | 2,61±1,37 |
| 7 | δ-3-careno | 1011 | 1008 | | | | | 0,37±0,21 | 0,31±0,12 | 0,42±0,11 | 1,07±0,26 | | | | 1,00±0,70 |
| 8 | α-terpineno | 1017 | 1014 | 0,43±0,20 | | 0,71±0,15 | 1,35±0,39 | | | | 0,10±0,17 | | | | |
| 9 | p-cimeno | 1025 | 1020 | 1,02±0,40 | 0,99±0,09 | 3,58±0,37 | 2,55±2,22 | 0,36±0,13 | | 0,30±0,12 | 0,10±0,17 | | | | |
| 10 | silvestreno | 1029 | 1025 | 0,31±0,15 | 0,11±0,20 | 0,71±0,09 | 1,04±0,21 | | | 0,20±0,11 | 0,39±0,07 | | 0,47±0,36 | 0,90±0,29 | 0,82±0,53 |
| 11 | (Z)-β-ocimeno | 1038 | 1032 | 0,70±0,23 | 0,30±0,13 | 2,43±0,17 | | 1,35±0,47 | 0,62±0,13 | 1,80±0,29 | 2,89±0,98 | | | | |
| 12 | (E)-β-ocimeno | 1048 | 1044 | 0,80±0,27 | 0,19±0,19 | 3,52±0,46 | | 2,04±0,57 | 0,50±0,11 | 2,25±0,27 | 5,11±1,81 | | | | |
| 13 | γ-terpineno | 1059 | 1054 | 1,22±0,33 | 0,62±0,23 | 2,20±0,40 | 3,84±0,64 | 0,22±0,04 | | 0,21±0,14 | 0,26±0,10 | | | | |
| 14 | p-menta-2,4(8)-dieno (isoterpinoleno) | 1089 | 1085 | | | 1,23±0,30 | 2,09±0,45 | | | | | | | | |
| 15 | terpinoleno | 1089 | 1086 | 0,69±0,13 | 0,27±0,12 | | | | | | | | | | |
| 16 | linalol | 1011 | 1095 | | | 0,48±0,08 | 0,28±0,25 | 0,36±0,13 | | 0,57±0,04 | 0,55±0,26 | | | | |
| 17 | safrol | 1290 | 1285 | | | | | 0,12±0,20 | | | 1,61±0,40 | | | | |
| 18 | δ-elemeno | 1338 | 1335 | 0,66±0,10 | 0,99±0,13 | 0,91±0,06 | 0,54±0,14 | 0,62±0,42 | 0,57±0,15 | 0,70±0,17 | 0,73±0,10 | 0,72±0,18 | 0,72±0,51 | 2,98±0,23 | 2,19±0,63 |
| 19 | ciclosativeno | 1365 | 1369 | 0,28±0,09 | 0,64±0,08 | 0,24±0,21 | 0,43±0,10 | | 0,37±0,05 | 0,41±0,02 | | | | | |
| 20 | α-copaeno | 1376 | 1374 | 5,73±0,60 | 7,06±0,17 | 4,08±0,18 | 4,41±1,28 | 2,17±0,74 | 3,23±0,44 | 2,39±0,16 | 0,72±0,14 | 1,25±0,33 | 1,84±0,72 | 0,77±0,08 | 1,96±0,45 |
| 21 | β-bourboneno | 1385 | 1387 | 0,89±0,11 | 0,91±0,28 | 1,55±0,05 | 0,88±0,30 | 2,34±0,57 | 2,56±0,48 | 5,37±0,54 | 0,66±0,04 | | | | |
| 22 | β-cubebeno | 1391 | 1387 | | 0,25±0,15 | | 0,10±0,17 | | | | | | | | |
| 23 | isolongifoleno | 1391 | 1389 | 0,38±0,05 | | | | | | | | | | | |
| 24 | β-elemeno | 1392 | 1389 | 0,49±0,07 | 0,95±0,11 | | 0,28±0,25 | | 0,26±0,24 | 0,48±0,04 | | 0,62±0,22 | 0,85±0,38 | 0,46±0,06 | 0,66±0,17 |
| 25 | metil eugenol | 1408 | 1403 | 0,52±0,14 | | 0,55±0,04 | 0,82±0,14 | 0,77±0,38 | 1,44±0,23 | 1,73±0,12 | 2,06±0,27 | | | | |
| 26 | β-cariofileno | 1419 | 1417 | 10,87±0,73 | 9,26±0,45 | 9,78±0,51 | 7,99±2,19 | 7,14±1,42 | 10,72±1,57 | 11,81±0,49 | 5,06±0,49 | 6,28±2,14 | 7,79±1,14 | 6,37±1,01 | 12,40±2,47 |
| 27 | β-copaeno | 1429 | 1430 | 0,66±0,10 | 1,08±0,16 | 0,73±0,01 | 0,82±0,25 | 0,74±0,33 | 0,94±0,15 | 1,35±0,08 | 0,11±0,10 | 0,20±0,35 | | 0,48±0,10 | 0,68±0,32 |
| 28 | aromadendreno | 1442 | 1439 | | 0,16±0,15 | 0,34±0,01 | | | 0,56±0,14 | 0,98±0,04 | | | | | |
| 29 | α-humuleno | 1454 | 1452 | 1,12±0,02 | 1,27±0,09 | 1,10±0,03 | 0,92±0,25 | 0,80±0,18 | 1,41±0,17 | 1,26±0,05 | 0,58±0,05 | 0,36±0,03 | 0,44±0,15 | 0,46±0,07 | 0,86±0,30 |
| 30 | croweacina | 1461 | 1457 | | | | | | | | | 1,22±2,11 | 2,74±1,87 | 0,69±0,18 | |
| 31 | allo-aromadendreno | 1461 | 1458 | | 1,14±0,10 | | | | | | | | | | |
| 32 | cis-cadina-1(6),4-dieno | 1463 | 1461 | | | | | | 0,26±0,23 | 0,67±0,01 | | | | | |
| 33 | ishwarano | 1467 | 1465 | | | | | | | | | 5,35±2,54 | 6,27±4,71 | | 2,89±1,32 |
| 34 | α-neocalitropseno | 1474 | 1474 | 0,53±0,03 | 0,84±0,05 | 0,60±0,07 | 0,37±0,32 | | 0,13±0,22 | | | | | | |
| 35 | γ-muuroleno | 1476 | 1478 | 0,72±0,07 | 1,65±0,19 | 0,73±0,07 | 0,79±0,23 | 0,47±0,15 | 0,71±0,05 | 0,54±0,06 | | | | 0,20±0,35 | |
| 36 | γ-curcumeno | 1477 | 1481 | | | | | | | | | 0,64±0,36 | 1,00±0,59 | 1,96±0,12 | 3,30±0,51 |
| 37 | germacreno D | 1481 | 1484 | 3,41±0,17 | 7,32±0,26 | 3,44±0,04 | 0,73±0,15 | 11,29±2,57 | 8,47±1,85 | 10,45±0,53 | 7,64±0,79 | | | | |
| 38 | β-selineno (β-eudesmeno) | 1486 | 1489 | 1,29±0,08 | 2,89±0,16 | 0,99±0,05 | 1,35±0,43 | 0,41±0,05 | 1,27±0,26 | 0,86±0,07 | 0,47±0,17 | | | | |
| 39 | biciclogermacreno | 1497 | 1500 | 12,65±0,54 | 10,95±0,20 | 11,52±0,32 | 2,64±0,56 | 8,85±1,53 | 7,55±0,75 | 7,65±0,26 | 4,71±0,89 | 6,64±2,20 | 9,98±1,79 | 12,23±1,05 | 16,55±2,19 |
| 40 | α-muuroleno | 1501 | 1500 | 1,81±0,09 | 2,62±0,34 | 1,36±0,01 | 1,17±0,29 | 0,71±0,36 | 1,58±0,29 | 1,35±0,07 | | | | 1,09±0,24 | 1,51±0,33 |

APÊNDICE 1 – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper marginatum* COLETADA NAS REGIÕES CENTRO-OESTE, NORTE E NORDESTE NAS QUATRO ESTAÇÕES

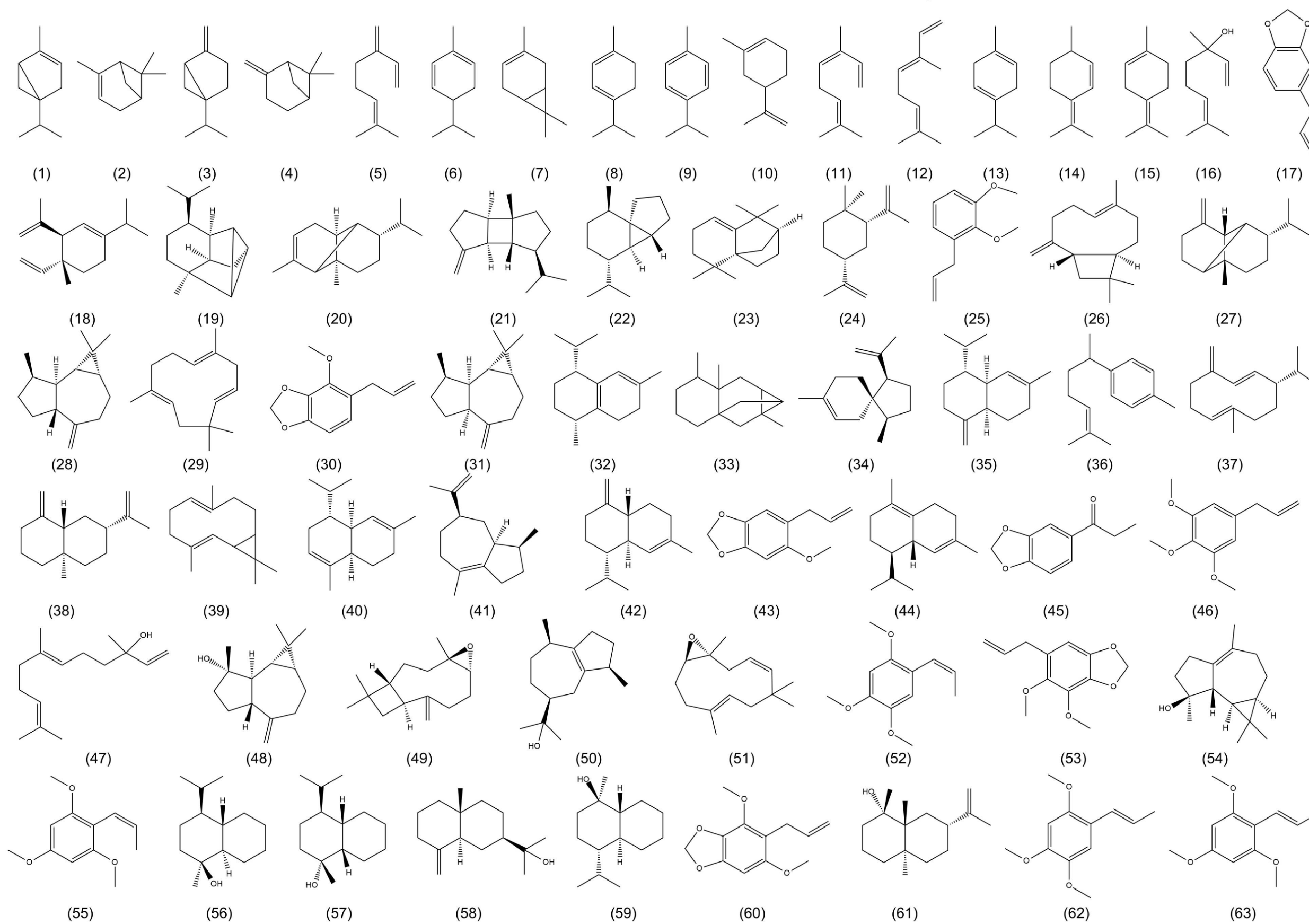
(conclusão)

| Constituintes | | IR ^a | IR ^b | CENTRO-OESTE ^e | | | | NORTE ^e | | | | NORDESTE ^e | | | |
|----------------------------------|---|-----------------|-------------------|---------------------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|-----------------------|-------------|------------|-------------|
| | | | | Verão | Outono | Inverno | Primavera | Verão | Outono | Inverno | Primavera | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| 41 | α-bulneseno (δ-guaieno) | 1506 | 1509 | 0,27±0,28 | 1,14±0,16 | 0,33±0,29 | 0,31±0,35 | | | | | | | | |
| 42 | γ-cadineno | 1513 | 1513 | 1,43±0,04 | 1,54±0,18 | 1,12±0,07 | | 7,21±2,77 | 0,81±0,71 | | | 0,26±0,01 | 0,11±0,20 | 0,35±0,17 | 0,29±0,07 |
| 43 | miristicina | 1515 | 1517 | 2,80±0,67 | 1,26±0,16 | 8,83±0,46 | 8,61±0,61 | 3,64±2,49 | 2,79±0,66 | 8,59±2,31 | 18,35±3,37 | | | | |
| 44 | δ-cadineno | 1525 | 1522 | 4,92±0,28 | 3,94±0,08 | 3,52±1,13 | 1,00±0,36 | 2,49±0,37 | 2,62±0,22 | 2,06±0,65 | 1,16±0,02 | | | | |
| 45 | 3,4-metilenodioxipropiofenona | 1534 | 1545 ^c | 3,97±0,48 | 2,23±2,02 | 4,84±0,46 | 7,00±2,64 | 21,72±1,63 | 7,45±3,49 | 4,45±0,75 | 26,62±7,63 | | | | |
| 46 | elemicina | 1560 | 1555 | 3,93±0,40 | 4,58±0,47 | 4,27±0,08 | 11,07±2,34 | 5,67±0,90 | 4,57±1,01 | 4,99±0,33 | 4,01±0,19 | | | | |
| 47 | (E)-nerolidol | 1565 | 1561 | 2,87±0,15 | 2,11±0,12 | 2,41±0,41 | 2,27±0,24 | 1,25±0,24 | 2,08±0,09 | 1,25±0,07 | 1,12±0,01 | | | | |
| 48 | espatulenol | 1578 | 1577 | 9,72±0,61 | 11,32±0,41 | 8,25±0,14 | 12,81±0,88 | 6,79±0,58 | 12,89±0,93 | 9,26±0,77 | 3,47±0,54 | | 1,56±0,34 | 1,97±0,17 | |
| 49 | óxido de cariofileno | 1584 | 1582 | 3,94±0,65 | 6,25±0,06 | 2,95±0,59 | 8,26±0,80 | 2,51±1,15 | 6,73±0,50 | 5,62±1,05 | 1,50±0,02 | | | | |
| 50 | guaiol | 1605 | 1600 | | | | | | 1,30±0,04 | 0,88±0,34 | | | | | |
| 51 | epóxido de humuleno II | 1610 | 1608 | | | | | | 1,26±0,07 | | | | | | |
| 52 | β-asarona | 1626 | 1616 | | | | | | | | | 1,63±0,22 | 1,01±0,33 | 0,54±0,52 | 0,32±0,55 |
| 53 | dilapiol | 1627 | 1620 | 1,09±0,09 | 0,92±0,06 | 0,78±0,08 | | | 0,46±0,40 | | | | | | |
| 54 | 2,4,6-trimetoxi-[(1Z)1-propenil]benzeno ^f | 1629 | - | | | | | | | | | 24,92±1,15 | 25,46±4,71 | 23,89±4,84 | 24,32±6,56 |
| 55 | isoespatulenol | 1631 | 1628 ^d | 3,34±0,10 | 3,31±0,70 | 2,33±0,16 | 3,19±0,38 | 1,97±0,63 | 2,29±0,04 | 1,24±0,11 | 1,16±0,45 | | | | |
| 56 | τ-cadinol (epi-α-cadinol) | 1644 | 1638 | 2,66±0,07 | | | | | | | | | | | |
| 57 | α-muurolol (δ-cadinol) | 1648 | 1646 | 0,45±0,39 | | | | | 0,73±0,09 | | | | | | |
| 58 | β-eudesmol | 1652 | 1649 | 2,16±0,13 | 1,68±0,07 | 0,96±0,11 | 0,99±0,17 | 0,92±0,18 | 2,26±0,12 | 1,31±0,04 | 1,06±0,04 | 0,63±0,09 | | | |
| 59 | α-cadinol | 1656 | 1652 | 4,42±0,26 | 3,97±0,07 | 2,07±0,17 | 1,27±0,21 | 1,63±0,10 | 3,04±0,11 | 1,88±0,05 | 1,37±0,05 | | | | |
| 60 | exalatacina | 1660 | 1655 | | | | | | | | | 26,47±3,29 | 17,73±1,98 | 16,68±1,40 | 12,67±4,92 |
| 61 | intermedeol | 1661 | 1665 | 1,90±0,11 | 0,30±0,51 | 0,90±0,12 | 0,86±0,13 | 1,03±0,07 | 2,37±0,12 | 1,49±0,06 | 1,21±0,07 | | | | |
| 62 | α-asarona | 1687 | 1675 | | | | | | | | | 2,69±0,20 | 1,57±0,67 | 0,67±0,62 | 0,17±0,30 |
| 63 | 2,4,6-trimetoxi-[(1E)1-propenil]benzeno (pipermarginina) ^f | 1720 | - | | | | | | | | | 19,31±3,21 | 13,29±3,78 | 12,86±1,46 | 2,63±2,06 |
| Hidrocarbonetos monoterpênicos | | | | 6,39±0,10 | 3,35±1,12 | 17,42±1,99 | 15,21±5,00 | 5,93±2,04 | 2,47±0,66 | 7,35±1,60 | 13,47±4,38 | 0,71±0,61 | 7,98±1,77 | 14,59±3,34 | 13,14±5,69 |
| Monoterpenos oxigenados | | | | | | 0,48±0,08 | 0,28±0,25 | 0,36±0,13 | | 0,57±0,04 | 0,55±0,26 | | | | |
| Hidrocarbonetos sesquiterpênicos | | | | 48,09±3,00 | 56,61±2,91 | 42,33±0,66 | 24,71±6,85 | 45,24±5,12 | 44,03±6,22 | 48,33±1,92 | 21,82±2,49 | 22,31±7,95 | 29,00±9,90 | 26,35±2,57 | 44,10±8,80 |
| Sesquiterpenos oxigenados | | | | 31,46±0,81 | 28,92±0,77 | 19,87±1,57 | 29,65±2,12 | 16,11±2,09 | 34,95±1,65 | 22,92±1,92 | 10,91±0,66 | 0,63±0,09 | | 1,56±0,34 | 1,97±0,17 |
| Arilpropanoides | | | | 12,31±1,61 | 8,99±2,68 | 19,26±0,44 | 27,50±5,52 | 31,93±3,71 | 16,70±5,46 | 19,76±3,16 | 52,65±7,21 | 76,25±7,54 | 61,79±12,21 | 55,34±6,34 | 40,11±14,30 |
| Total | | | | 98,25±0,10 | 97,87±0,27 | 99,37±0,07 | 97,35±1,81 | 99,57±0,75 | 98,14±0,35 | 98,94±0,16 | 99,41±0,06 | 99,90±0,17 | 98,77±0,76 | 98,84±0,87 | 99,32±0,22 |

NOTA: ^aO índice aritmético apresentado é a média dos valores calculados para cada triplicata. ^bÍndice aritmético baseado na literatura (ADAMS, 2007). ^cANDRADE, E. H. A. et al. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 197-208, 2008. ^dÍndice de retenção baseado na literatura (NIST WebBook, 2017). ^eOs resultados apresentados são as médias das triplicatas ± desvio padrão.

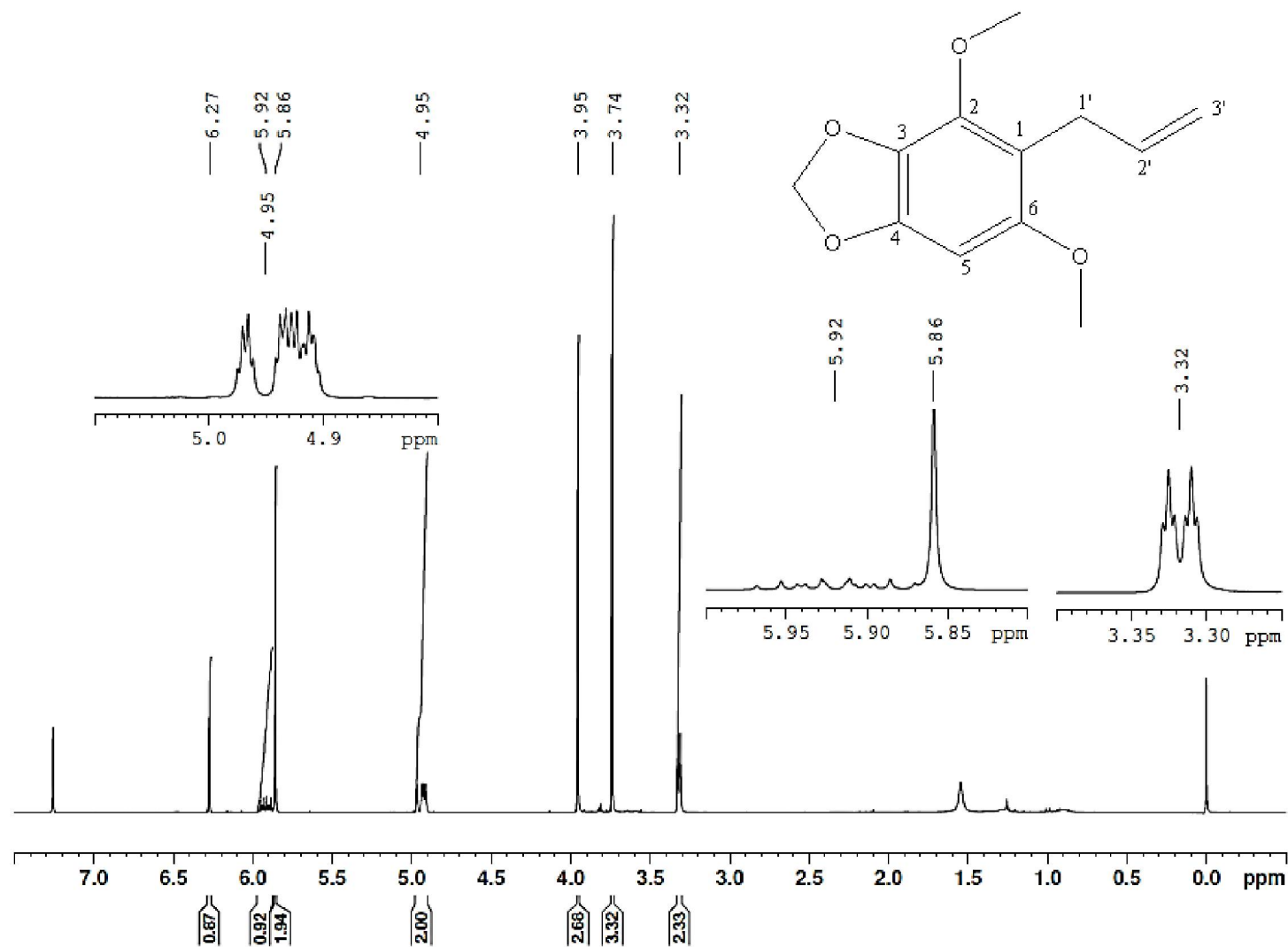
^fConstituintes identificados por CG-EM e RMN.

APÊNDICE 2 – CONSTITUINTES ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. marginatum*

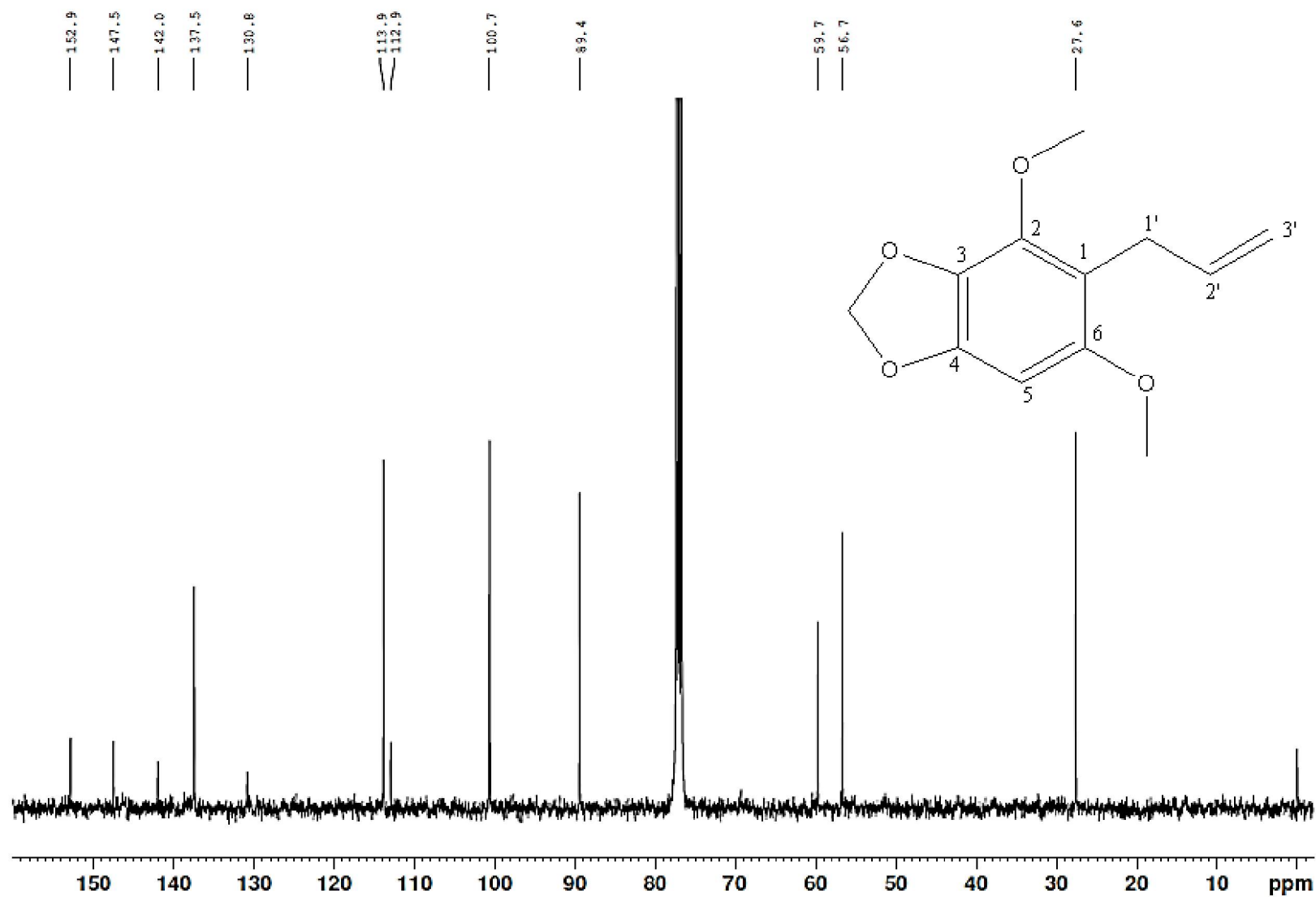


NOTA: Numeração conforme Apêndice 1 (p. 84 e 85).

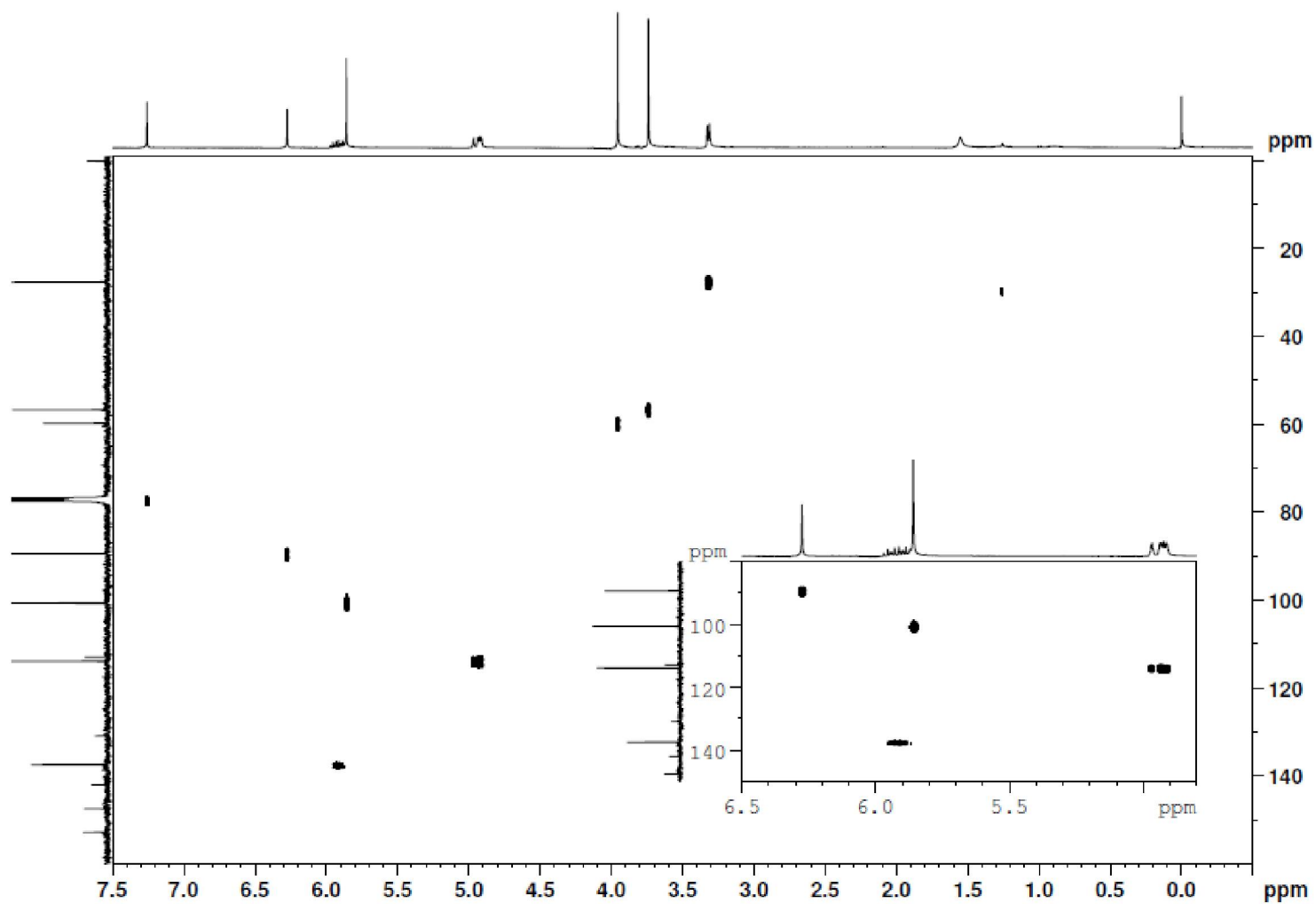
APÊNDICE 3 – ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) DE A10-3



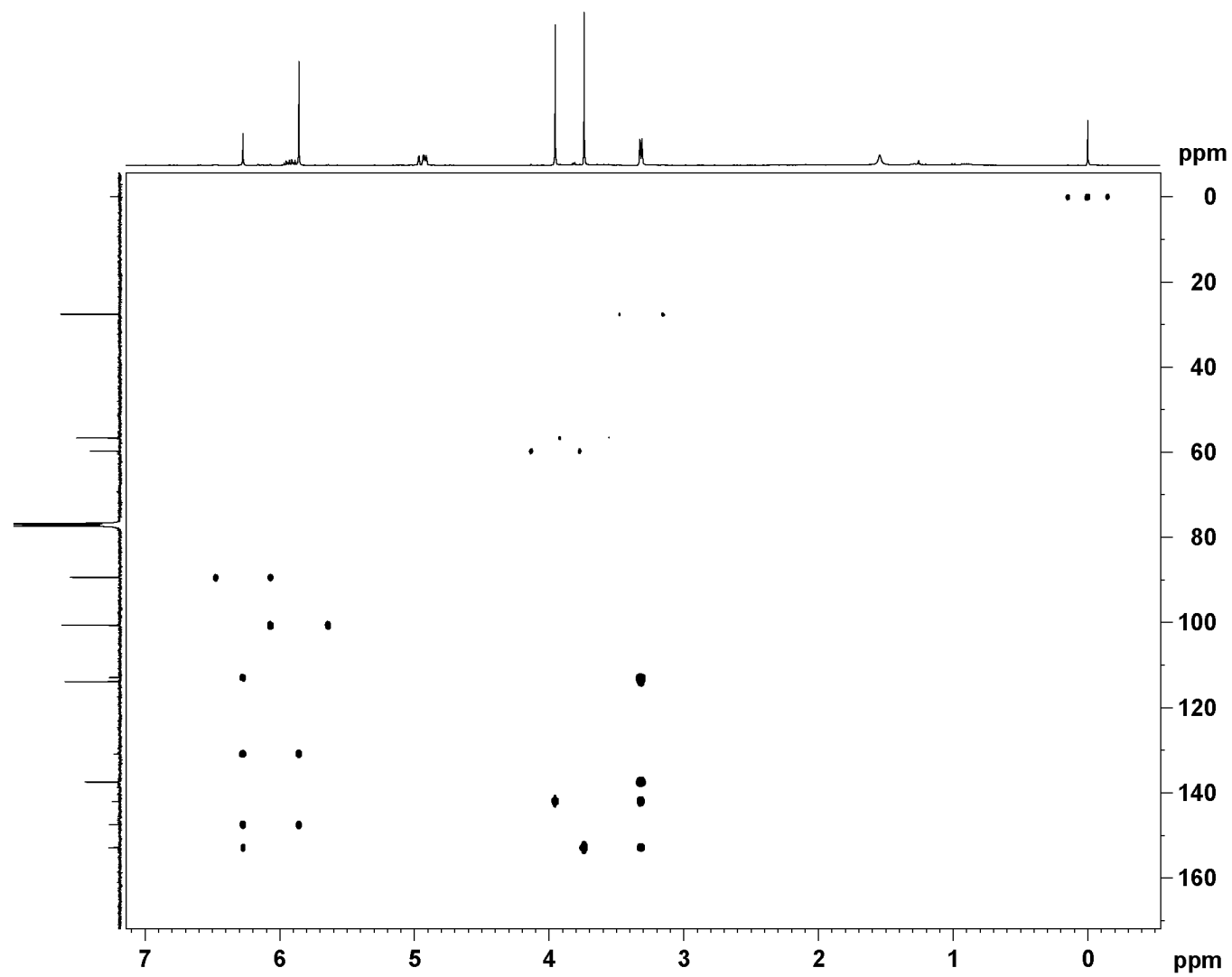
APÊNDICE 4 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) DE A10-3



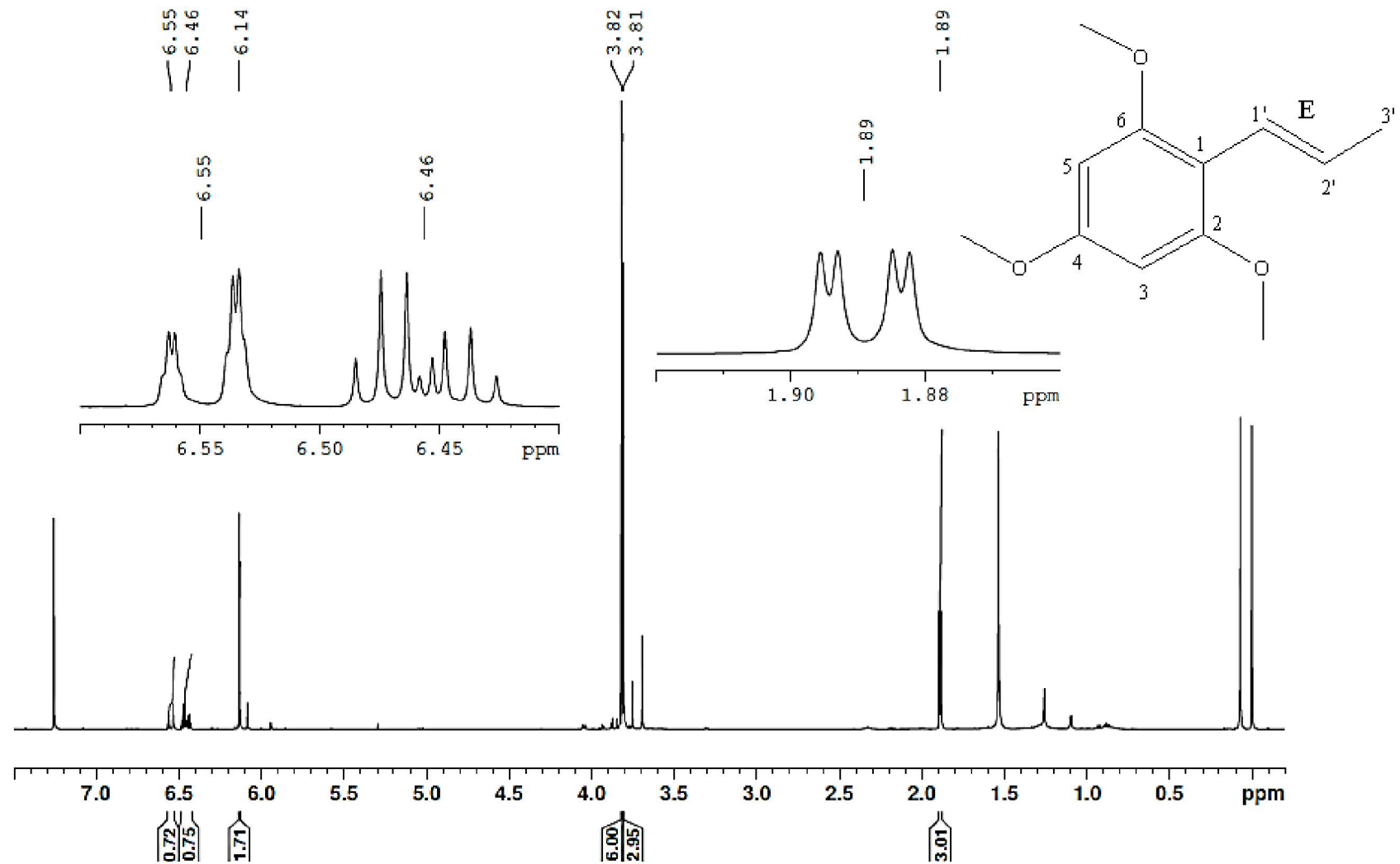
APÊNDICE 5 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-3



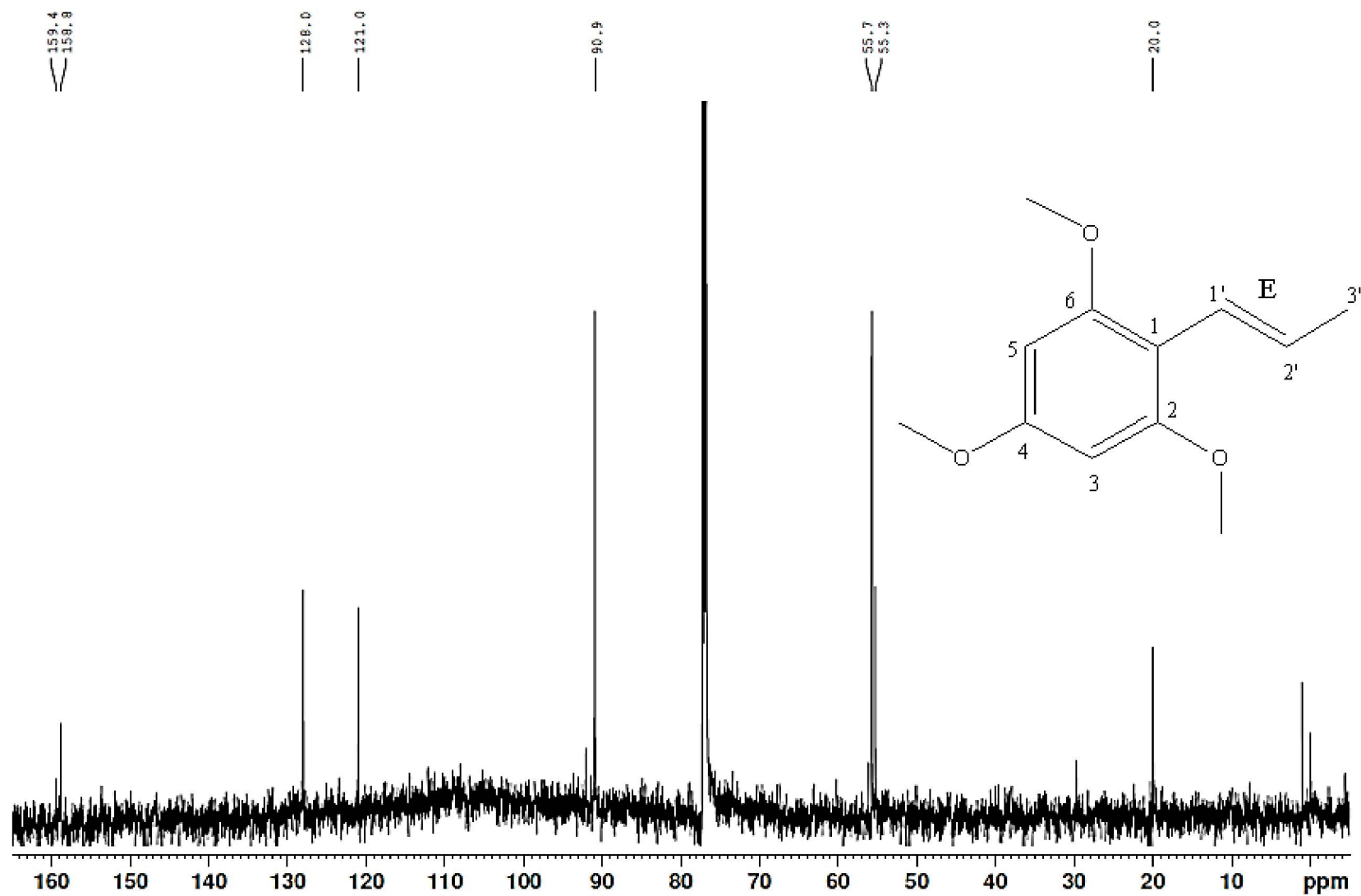
APÊNDICE 6 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHZ, CDCl_3) DE A10-3



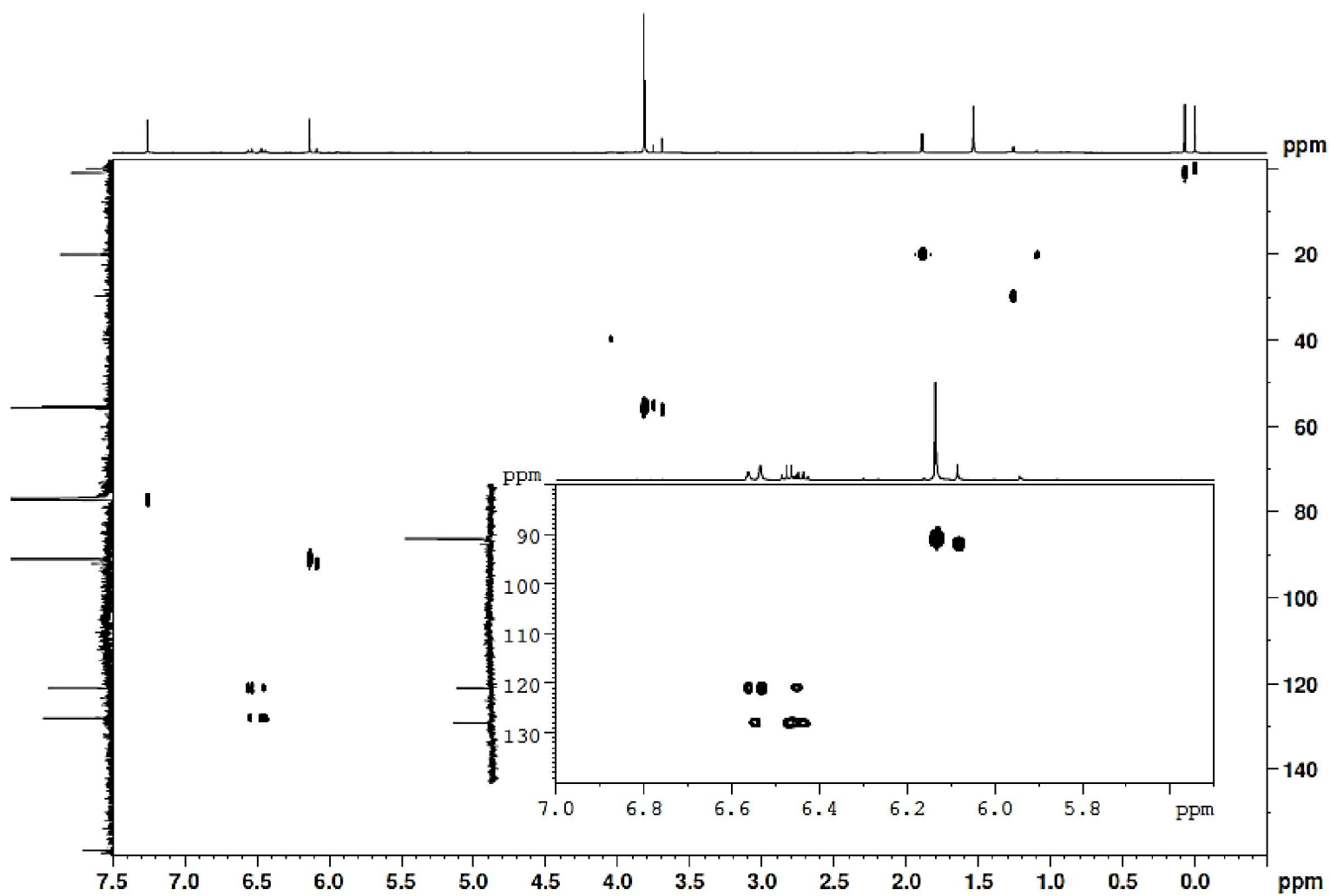
APÊNDICE 7 – ESPECTRO DE RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2B



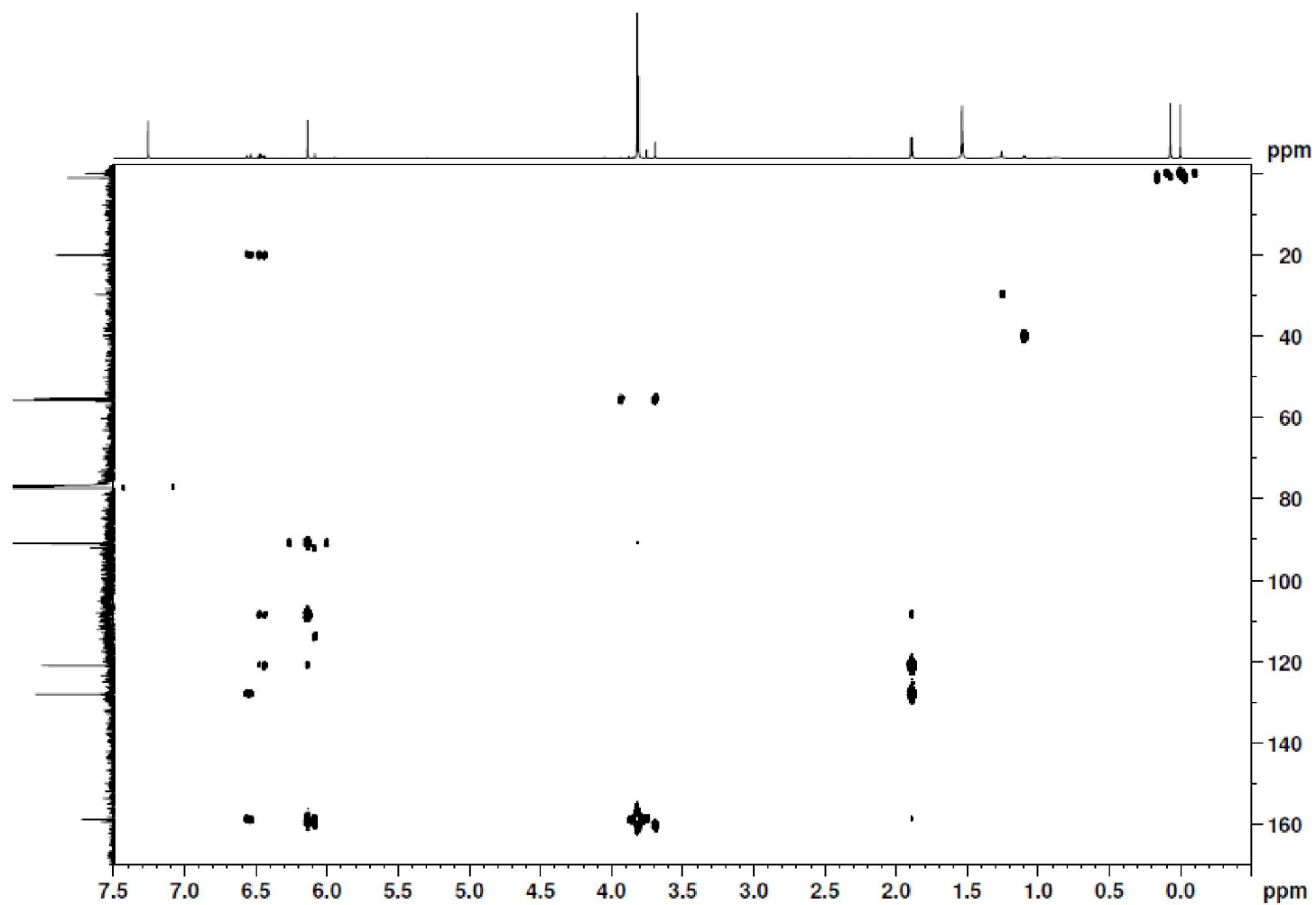
APÊNDICE 8 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) DE A10-2B



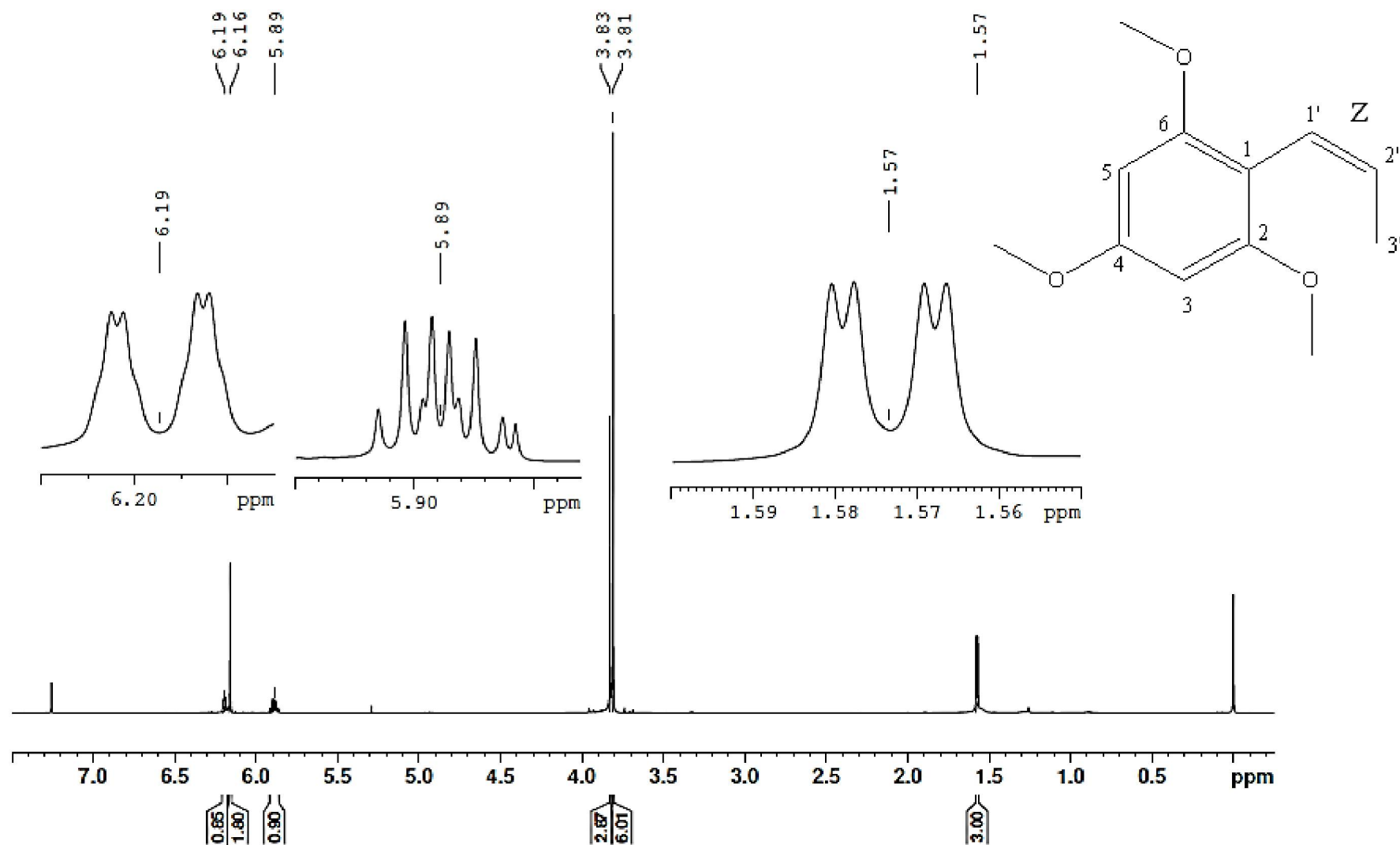
APÊNDICE 9 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2B



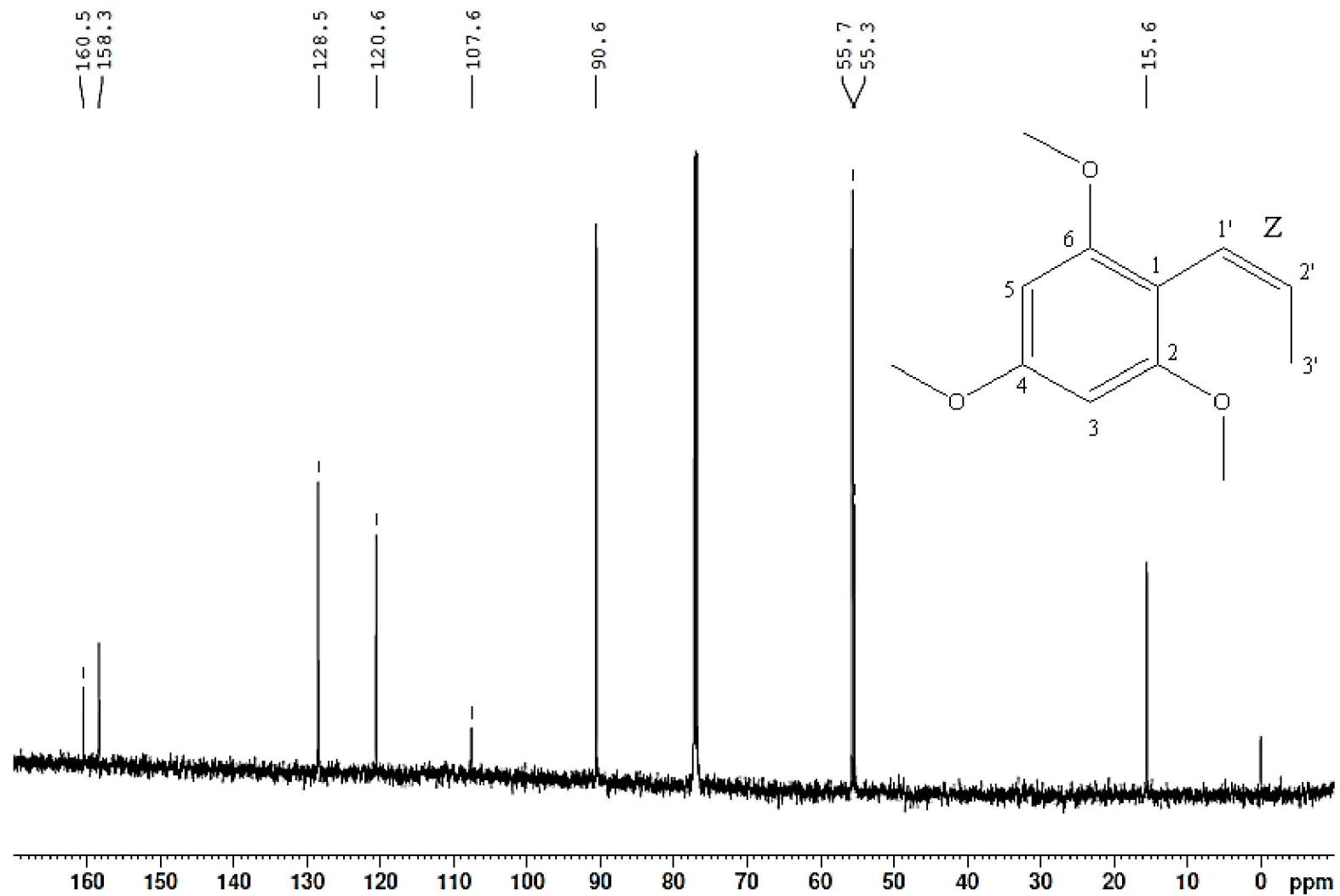
APÊNDICE 10 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2B



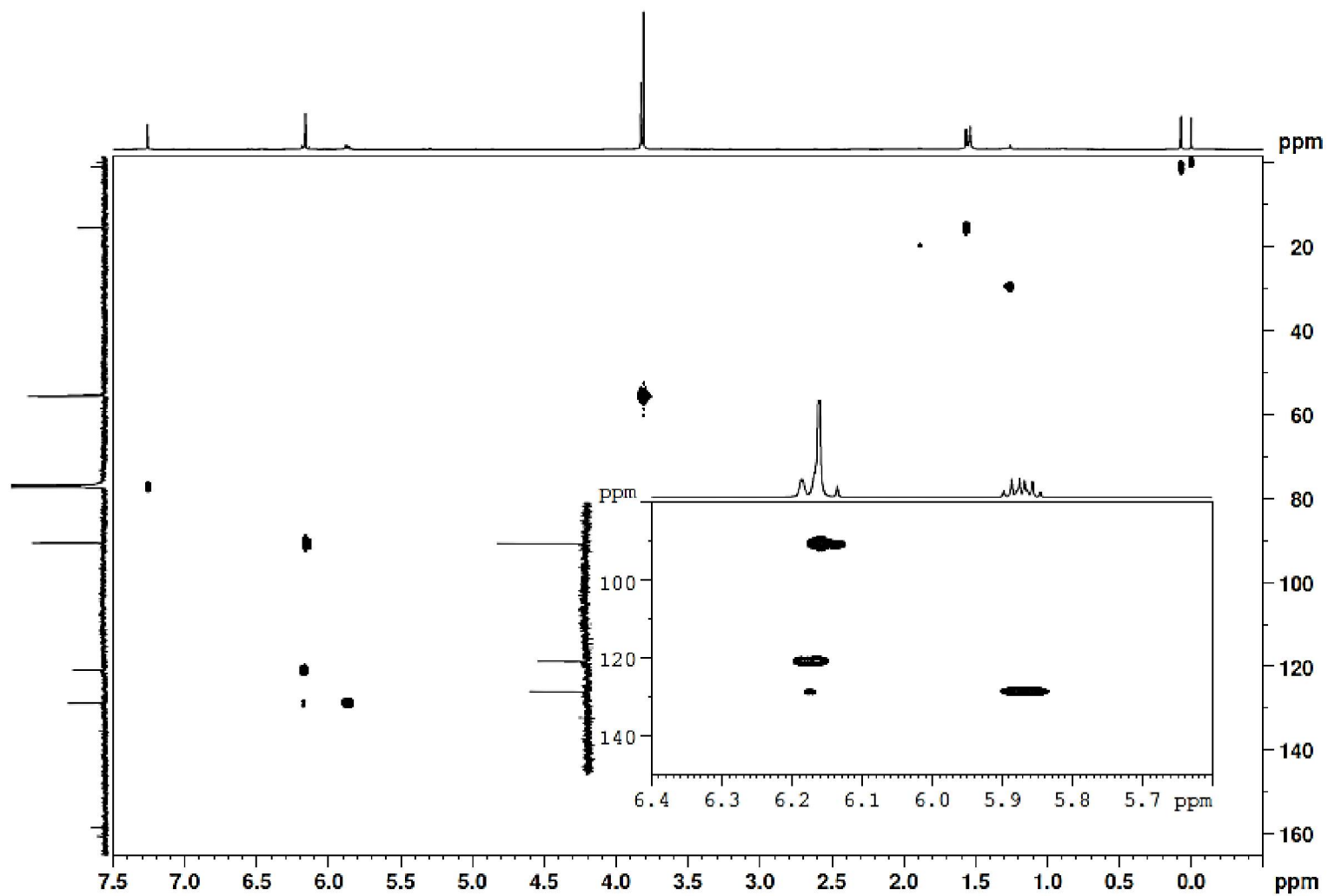
APÊNDICE 11 – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) DE A10-2A



APÊNDICE 12 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) DE A10-2A



APÊNDICE 13 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2A



APÊNDICE 14 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DE A10-2A

